

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ATMOSFERA GASOSA CONTROLADA (20% VS. 5% DE O₂) NO CULTIVO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

KATIELEN MOTA DA SILVA¹; YASMIM DE MACEDO CORRÊA²; LUIZA CARVALHO RODALES³; LIGIA MARGARETH CANTARELLI PEGORARO⁴; CHRISTIANO FANCK WEISSHEIMER⁵.

¹Universidade Federal de Pelotas – katielen_motta@outlook.com

²Universidade Federal de Pelotas – yasmimcorrea.biotec@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – luizacarvalhorodales6@gmail.com

³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – ligia.pegoraro@embrapa.br

⁴Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – christiano.fanck@embrapa.br

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior fornecedor de carne e o terceiro maior produtor de leite do mundo (BRASIL, 2024), de maneira que a bovinocultura desempenha um papel importante na economia do país. Para atender as demandas de produção e garantir a lucratividade do setor, produtores e indústrias têm recorrido à biotecnologia, especialmente às tecnologias de reprodução assistida (TRAs), tais como a produção *in vitro* de embriões (PIVE). No Brasil, o uso da PIVE tem se tornado fundamental, posicionando o país como líder mundial em transferências de embriões PIVE (VIANA, 2022). No entanto, o processo ainda enfrenta desafios referentes ao seu baixo rendimento, ao custo do processo e também à composição dos meios e da atmosfera gasosa do ambiente de cultivo (OLIVEIRA *et al.*, 2023).

A PIVE permite o contato entre os gametas feminino e masculino fora do trato reprodutivo, levando a formação de um novo indivíduo. Seu objetivo é o melhoramento animal, uma vez que possibilita a seleção e multiplicação em larga escala dos animais de melhor genética e ainda diminui o intervalo entre gerações. O procedimento é realizado no ambiente controlado de um laboratório de reprodução e envolve as etapas de obtenção e seleção de complexos *cumulus*-oócitos (CCOs), maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) (OLIVEIRA *et al.*, 2023).

O CIV se refere ao desenvolvimento do embrião após a fecundação até o estágio de blastocisto. O meio de cultivo deve mimetizar o ambiente tubário e uterino, permitindo a nutrição e desenvolvimento do embrião, com pH, nutrientes, hormônios e oxigênio equilibrados, da forma mais semelhante possível à produção *in vivo* (SOUZA; ABADE, 2018). Entretanto, ainda se observa diferenças significativas de qualidade entre os embriões, evidenciando que a técnica necessita de melhorias.

Uma otimização relevante está no controle da atmosfera gasosa do ambiente de cultivo. A composição atmosférica mais utilizada inclui 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂, semelhante ao ambiente fisiológico do trato reprodutivo. Porém, a atmosfera com 20% de O₂ ainda é usada por ser menos custosa, apesar de causar estresse oxidativo e danos a proteínas, lipídeos e DNA (BELLI *et al.*, 2020). Esses efeitos podem ser reduzidos ao controlar variáveis como o meio de cultivo, de forma que mais estudos são necessários para avaliar protocolos e condições ideais de cultivo (MARSICO *et al.*, 2023).

Assim, com base nas informações mencionadas, o objetivo principal deste trabalho é avaliar o efeito de duas atmosferas gasosas no CIV de embriões bovinos (20% vs. 5% de O₂), observando parâmetros referentes ao desenvolvimento embrionário, tais como taxa de clivagem, taxa de desenvolvimento embrionário e taxa de rendimento global da PIVE.

2. METODOLOGIA

A metodologia deste trabalho seguiu o Manual de Procedimentos para Produção *In Vitro* de Embriões Bovinos do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Terras Baixas e foi realizada em cinco rotinas durante os meses de junho e julho de 2024. Foram utilizados meios comerciais (LAV, MIV, H-199, FIV Touro, FIV gotas e CIV) e óleo mineral, preparados conforme as instruções da fabricante.

Os oócitos foram obtidos de ovários provenientes de abatedouro que foram aspirados no laboratório com auxílio de bomba de vácuo. Os CCOs selecionados conforme características morfológicas foram maturados *in vitro* (MIV) por 22 a 24 horas em estufa de 5% de CO₂ a 39°C. No dia seguinte, foi realizada a preparação espermática utilizando sêmen congelado de Touro Nelore, descongelado em banho-maria a 35°C. A seleção espermática foi feita com gradiente de Percoll (90 e 45%), seguido de centrifugação. A dose inseminante foi ajustada para 1,0 x 10⁶ espermatozoides/mL com base na motilidade e na concentração espermática e a inseminação foi realizada em gotas de meio FIV, com co-cultura com os oócitos por 18 a 20h a 39°C em estufa de 5% de CO₂. Após a fecundação, os prováveis zigotos foram desnudados para remoção das células do *cumulus* e transferidos para gotas de meio CIV. O cultivo foi realizado em duas atmosferas gasosas: 5% de O₂ (zigotos incubados em *bag* com mistura gasosa de 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂) e 20% de O₂ (zigotos incubados sem *bag* na mesma estufa de 5% de CO₂ com O₂ atmosférico).

A avaliação da clivagem foi feita no D2, contabilizando o número de embriões clivados em relação ao número total de oócitos cultivados. Nos D7 e D8, foi avaliado o desenvolvimento embrionário, com o número de embriões viáveis sobre o total de embriões clivados, e o rendimento global foi calculado com base no número de embriões desenvolvidos em relação ao número de oócitos cultivados. A análise estatística foi feita com o software GraphPad Prism 9.5, utilizando teste T.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho foram obtidos com a avaliação da taxa de clivagem dos embriões, com o desenvolvimento embrionário (DE) e com rendimento global de blastocistos (RG) no sétimo (D7) e oitavo (D8) dias de cultivo, em cinco repetições. A análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os sistemas de cultivo com atmosfera gasosa controlada sobre a tensão de 20% e 5% de O₂ em nenhum dos parâmetros avaliados, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Médias das taxas de clivagem, desenvolvimento embrionário e rendimento global nas atmosferas de 20 e 5% de O₂ na PIVE de bovinos

Sistema de cultivo – Atmosfera	Oócitos N	Clivagem (X ± SD)	D7		D8	
			DE	RG	DE	RG
20% O ₂ (estufa 5% CO ₂)	380	58,22 ± 15,30	48,72 ± 17,98	27,90 ± 11,82	48,58 ± 15,14	27,52 ± 9,434
5% O ₂ (<i>bag</i> - 5% O ₂ , 5% CO ₂ e 90% N ₂)	355	58,06 ± 10,24	50,74 ± 16,93	28,5 ± 6,966	51,02 ± 21,72	28,44 ± 8,843

Fonte: dados do autor. Análise estatística pelo teste T não detectou diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$).

Verificando os resultados de rendimento global em D7 e os comparando com trabalhos desenvolvidos por outros pesquisadores, encontramos dados tanto semelhantes como contrários a estes. Nas atmosferas de 20 e 5% de O₂, respectivamente, foram obtidas 27,9% e 28,5% de rendimento, concordando com Santos *et al.* (2018), que obtiveram 34,6% e 37%, ou seja, também sem diferença estatística entre os tratamentos. Em contrapartida, Leite *et al.* (2017) obtiveram 25,5% e 38,8%, e portanto uma maior taxa de blastocistos quando os embriões foram cultivados na atmosfera de 5% de O₂. Dessa forma, é evidenciado que o controle da atmosfera nem sempre é crucial, mas pode otimizar a produção embrionária em condições específicas, como ao trabalhar com raças de baixa produtividade, oócitos de qualidade inferior, MIV insatisfatória ou quando os meios utilizados não são de alta complexidade.

El-Sanea *et al.* (2021) testaram antioxidantes no meio de maturação e seus resultados sugerem que a ausência de influência da atmosfera no desenvolvimento embrionário pode ser explicada pelo uso de meios mais completos. Em seu estudo, oócitos de búfala, sob 20% de O₂, foram suplementados com ácido ascórbico (50 µM) ou melatonina (10⁻⁵ M), resultando em maiores taxas de fecundação (72,2% para 77,8% e 87,3%), clivagem (66,8% para 70,8% e 86,6%) e blastocistos (19,9% para 23% e 31,2%), mostrando que esses antioxidantes aliviam os efeitos da alta tensão de O₂. No presente experimento, foram usados meios comerciais para isolar o efeito da atmosfera controlada, e as taxas de clivagem e blastocistos foram semelhantes sob 20% e 5% de O₂. Isso sugere que a composição do meio minimizou os efeitos adversos da alta tensão de O₂. Dessa forma, futuros estudos podem investigar a influência da presença de fatores antioxidantes nesses meios sob o controle de O₂ nas atmosferas de cultivo.

Além disso, a presença de células do *cumulus* pode ter influenciado os resultados. Mesmo após o desnudamento dos zigotos, algumas células permaneceram, e, conforme Corrêa *et al.* (2008), essas células secretam fatores embriotróficos que beneficiam o desenvolvimento de embriões bovinos, além de produzirem agentes neutralizantes, tais como antioxidantes e quelantes de metais pesados, assim removendo as substâncias embriotóxicas do meio e protegendo os oócitos e embriões do estresse oxidativo causado pela maior tensão de O₂.

É importante ressaltar que maiores estudos são necessários para testar a viabilidade dos embriões, já que a avaliação foi apenas morfológica. Recomenda-se a realização de análises metabólicas e genéticas, como quantificação de transcritos por RT-qPCR (MARSICO *et al.*, 2023), pois semelhanças na taxa de blastocistos não excluem possíveis danos ao DNA e à célula causados pelo acúmulo de EROs. Estudos futuros podem usar Microscopia Eletrônica de Transmissão, contagem de blastômeros e marcadores de viabilidade celular, além de testar a criopreservação e viabilidade pós-transferência para receptoras.

4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados do experimento, concluiu-se que as diferentes tensões de O₂ não interferiram nas taxas de clivagem, no desenvolvimento embrionário nem no rendimento global da PIVE, sendo possível, portanto, a realização do CIV de embriões bovinos produzidos *in vitro* em ambas as atmosferas gasosas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELLI, Manuel *et al.* The effect of low and ultra-low oxygen tensions on mammalian embryo culture and development in experimental and clinical IVF. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 66, n. 4, p. 229–235, 2020. DOI: 10.1080/19396368.2020.1754961.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Mapa do Leite**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/mapa-do-leite>. Acesso em 07 de ago. de 2024.
- CORRÊA, Geórgia Assis *et al.* Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Animal Reproduction Science**. [s.l.]. v. 104, n. 2-4, p. 132-42, 2008. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2007.02.002.
- EL-SANEA, Amro M. *et al.* Effect of oxygen tension and antioxidants on the developmental competence of buffalo oocytes cultured *in vitro*. **Vet World**. [s.l.]. v. 14, n. 1, p. 78-84, 2021. DOI: 10.14202/vetworld.2021.78-84.
- EMBRAPA. **Manual de Procedimentos para Produção *In vitro* (PIV) de Embriões Bovinos**. Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Clima Temperado, Capão do Leão/RS, 2016.
- LEITE, Roberta Ferreira *et al.* Oxidative Stress Alters the Profile of Transcription Factors Related to Early Development on *In vitro* Produced Embryos. **Oxid Med Cell Longev**. [s.l.]. 2017. DOI: 10.1155/2017/1502489.
- MARSICO, Thiago Vieira *et al.* Unraveling the Consequences of Oxygen Imbalance on Early Embryo Development: Exploring Mitigation Strategies. **Animals (Basel)**. v. 13, n. 13, 2171. DOI: 10.3390/ani13132171.
- OLIVEIRA, André Freitas de *et al.* **Produção *In vitro* de Embriões Bovinos: Revisão de Literatura**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina Veterinária) - Centro Universitário Brasileiro, Recife, 2023.
- SANTOS, Mariana *et al.* Cultivo *In vitro* de Embriões Bovinos em Diferentes Tensões de Oxigênio. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 55; Congresso Brasileiro de Zootecnia, 28. 2018. **Anais [...]**. Goiânia. Disponível em: <http://www.adaltech.com.br/anais/zootecnia2018/resumos/trab-1557.pdf>. Acesso em: 05 ago. 2024.
- SOUZA, Natielly Sampaio de; ABADE, Cristiane Caroline. Produção *In vitro* De Embriões Bovinos: Etapas de Produção e Histórico no Brasil. **Ciência Veterinária UniFil**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 95 - 108, 2018.
- VIANA, Joao Henrique Moreira. 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**, v.40, n.4, p. 22-40, 2022.