

FECUNDAÇÃO *IN VITRO* NA PRESENÇA DE FRAGMENTOS DE MUCOSA DO OVIDUTO FRESCA E CONGELADA

João Victor Barbosa da Silva (IFPA), Nicole Samara Amaral Cordeiro (IFPA); Bruno Porpino Homobno (UFPA); Nathália Nogueira da Costa Almeida (UFPA), Simone do Socorro Damasceno Santos (UFPA), Marcela da Silva Cordeiro (IFPA)

Autor correspondente: joaobarbos29@gmail.com

ÁREA TEMÁTICA E ODS

Área de conhecimento/Subárea: Ciências Agrárias / Zootecnia

ODS vinculado: ODS 2

INTRODUÇÃO

O Pará com 10,6% do rebanho nacional (24,8 milhões de cabeças) se tornou o segundo colocado no efetivo de animais, com São Félix do Xingú mantendo a liderança no ranking de municípios com 2,5 milhões de cabeças. Graças ao rebanho da Amazônia, o Brasil detém hoje o 2º maior rebanho comercial do mundo, sendo o maior exportador mundial de carne bovina (IBGE, PPM 2022).

É indiscutível a importância que a pecuária bovina representa para a econômica, entretanto, por estar atrelada ao aumento do desmatamento da Amazônia para criação de áreas de pastagens, a pecuária acaba se tornando uma grande vilã das mudanças climáticas. Tornando cada vez mais urgente a busca por tecnologias que aumentem a produtividade do rebanho e, consequentemente, reduzam as áreas de pastagem como a Produção *In Vitro* de Embriões (Ferré et al., 2020; Santos et al., 2018).

Apesar do relevante progresso alcançado nos últimos anos e de ser bastante difundida e utilizada comercialmente em vários países a técnica de PIVE ainda necessita de aprimoramentos. Sabemos que o oviduto é o órgão responsável em proporcionar um ambiente adequado para os processos de armazenamento, liberação, capacitação espermática e reação acrossômica, bem como a maturação oocitária final (Mahé et al., 2021). Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da presença de fragmentos de mucosa do oviduto (FMO) fresca ou congelada durante a etapa de fecundação *in vitro* sobre as taxas de clivagem, formação de blastocisto, cinética do desenvolvimento e expressão gênica embrionária.

MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento, por ser realizado exclusivamente com material proveniente de abatedouro, não necessitou de aprovação em comitê de ética no uso de animais.

No laboratório, a tuba foi isolada e a região correspondente a ampola foi seccionada (Figura 1). Em uma placa de petri esteril, a ampola foi comprimida, com auxílio de um bisturi, no sentido do istmo ao infundíbulo para que os fragmentos de mucosa fossem liberados. Tais fragmentos foram submetidos a pipetagens e passaram por dois processos de centrifugação com Meio 199.

Posteriormente, para o congelamento, os FMO foram ressuspensos em solução de congelamento.

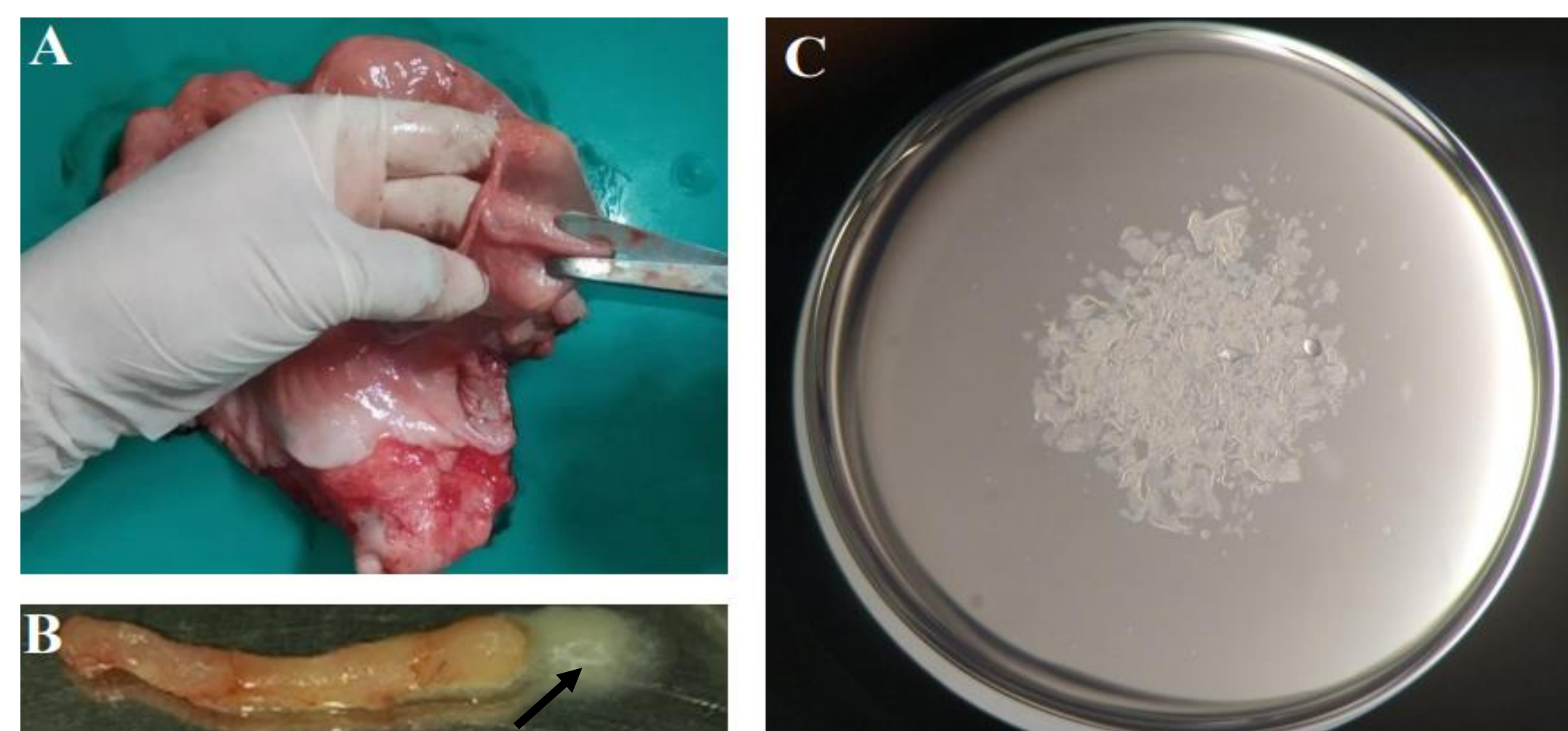


Figura 1: A – Secção da região da ampola do oviduto; B: Fragmentos de mucosa do oviduto expostos após a compressão (seta preta); C: Fragmentos de mucosa do oviduto depositada na gota maturação.

Para a congelação os fragmentos de mucosa do oviduto foram ressuspensos em 1 mL de solução de congelamento [800 µL de soro fetal bovino, 200 µL de dimetilsulfóxido e 50 µg/mL de gentamicina). Os criotubos foram colocados em um suporte com álcool metílico e levados para o freezer -80°C, onde permaneceram até o momento da descongelação.

Para a descongelação o criotubo foi colocado em banho maria a 38,5°C por 20 segundo. Em seguida a amostra foi depositada em minitubo de centrífuga com 1 mL de Meio 199 acrescido de 20% de SFB, 0,125 M de sacarose e 50 µg/mL de gentamicina, centrifugado (600g) por 10 segundos e o pellet ressuspensos em 1 mL do mesmo meio onde permaneceram por 5 minutos.

Fragmentos do epitélio tubários fresco e pós criopreservação foram depositados em gotas de 100 µL de meio de MIV (Meio 199 suplementado com 10% de SFB, hormônios, antibióticos e piruvato) por 18-20 horas para poderem ser utilizados no processo de fecundação *in vitro*.

Os processos de maturação oocitária, fecundação, cultivo embrionário e amplificação da expressão genica foram realizados de acordo com o protocolo padrão do laboratório.

Neste experimento a fecundação *in vitro* foi realizada de acordo com os seguintes grupos experimentais: Grupo Controle (fecundação sem fragmentos de mucosa do oviduto); Grupo FMO Fresca (fecundação na presença de fragmentos de mucosa do oviduto fresca), Grupo FMO e Grupo FMO Congelada (fecundação na presença de fragmentos de mucosa do oviduto pós-descongelação).

As taxas de clivagem (dia 4) formação de blastócito (dia 8), cinética do desenvolvimento (dia 8) e expressão gênica embrionária foram submetidas a ANOVA (p<0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas 6 repetições, totalizando 634 complexos cumulus oócitos (CCOs), distribuídos entre os Grupos Controle (259), FMO fresca (207) e FMO Congelada (168).

Não houve diferença nas taxas de clivagem, formação de blastocisto e cinética embrionária entre os grupos experimentais (Tabela 1).

Tabela 1: Taxas de clivagem, formação de blastocisto e cinética embrionária após fecundação *in vitro* na presença de fragmentos de mucosa do oviduto fresca e congelada.

Grupos Experimentais	n	% Clivagem M±DP	% Blastocisto M±DP	Blastocisto	Cinética Blastocisto Expandido	Blastocisto Eclodido
Controle	259	89,46 ± 5,87	41,68 ± 6,08	1,83 ± 4,3	48,83 ± 24,63	48,75 ± 26,28
FMO fresca	207	88,60 ± 7,16	45,25 ± 7,36	5,2 ± 7,13	34,00 ± 11,27	59,90 ± 9,57
FMO Congelada	168	88,80 ± 3,35	42,99 ± 7,73	-	41,42 ± 24,18	58,14 ± 24,23

n= número amostral; M±DP: média±desvio padrão.

A análise da abundância relativa de transcritos gênicos não revelou diferença estatística para o OCT4 (P=0,298), mostrando que o FMO não interferiu no padrão comum de desenvolvimento embrionário, corroborando os resultados de cinética.

Entretanto, a análise da expressão gênica de transcritos relacionados ao estresse térmico (HSP70, P=0,001), proteção celular contra danos oxidativos (SOD2, P=0,01) e GLUT1 (P=0,001) mostraram menor expressão no Grupo FMO fresca, como pode ser observado na Figura 2.

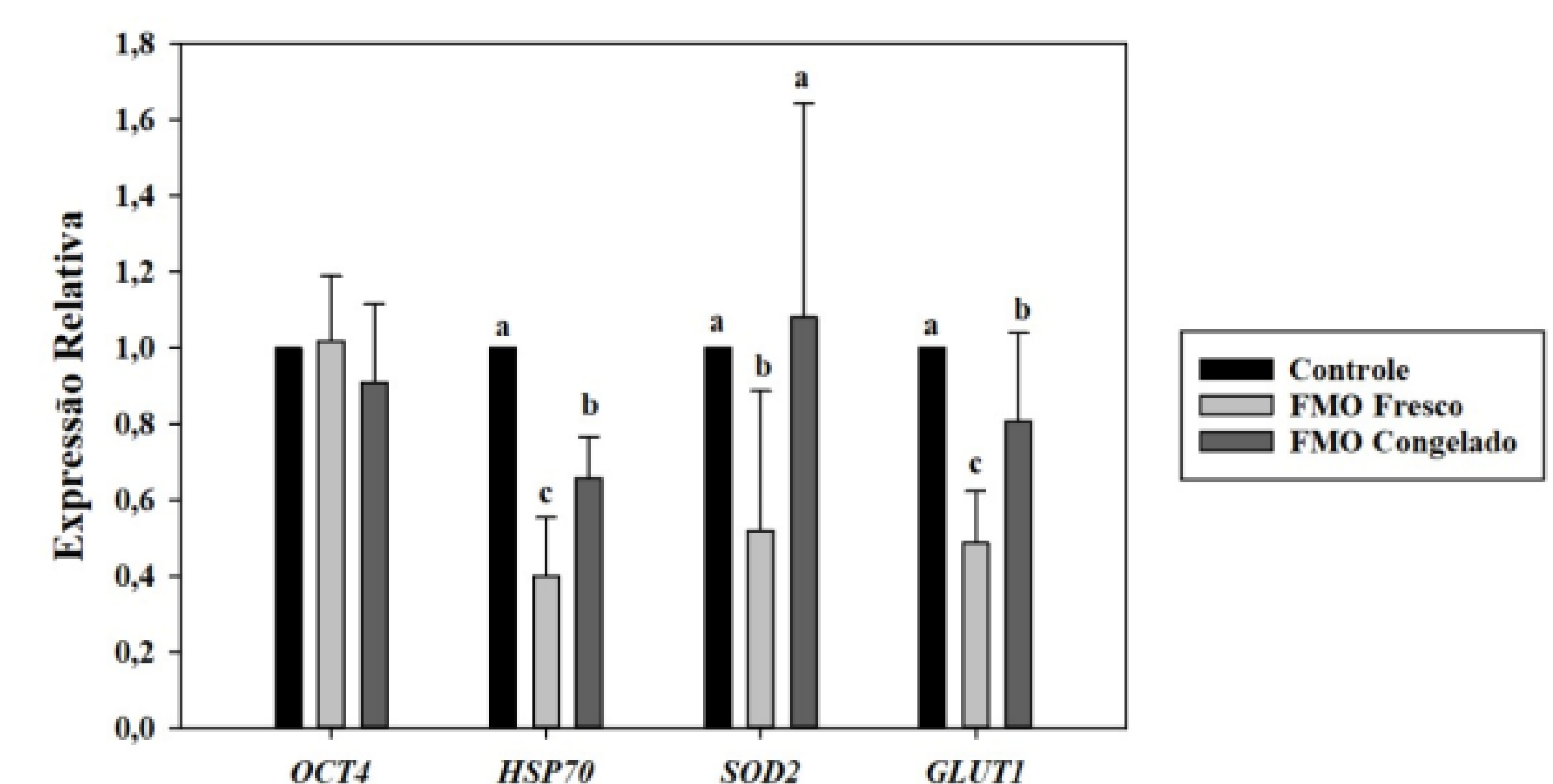


Figura 2: Não houve diferença em relação a expressão de OCT4 entre os grupos experimentais. O Grupo FMO fresca expressou menos HSP70 (P=0,001), SOD2 (P=0,01) e GLUT1 (P=0,001) que os Grupos Controle e FMO congelada.

Os resultados positivos da avaliação qualitativa baseada na expressão gênica embrionária, mesmos após congelamento, demonstram que a adição de fragmentos de mucosa do oviduto pode ser uma estratégia bastante promissora aos protocolos de PIVE. Os FMO por serem de fácil obtenção e manipulação tornam-se um importante modelo para o estudo *in vitro* da interação entre esses diferentes tipos celulares.

CONCLUSÃO

A presença de fragmentos de mucosa do oviduto fresco durante a fecundação *in vitro* reduzem a expressão de transcritos para HSP70, SOD2 e GLUT1, e mesmo após congelação mantem a expressão reduzida de HSP70 e GLUT1, sugerindo um efeito benéfico de sua presença no sistema de produção *in vitro* de embriões

REFERÊNCIAS

- IBGE. Pesquisa Pecuária Municipal. Rio de Janeiro: v. 50, p.1-12, PPM, 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria.html>. Acessado em abril de 2024.
- FERRÉ, L. B. et al. Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, v. 14, n. 5, p. 991-1004, 2020.
- MAHÉ C. et al. Sperm migration, selection, survival, and fertilizing ability in the mammalian oviduct. *Biol Reprod*. Aug 3;105(2):317-331, 2021.
- SANTOS, G.; TORTORELLA, R.D.; FAUSTO, D. Rentabilidade na pecuária de corte. *Revista IPecege*, 4 (1), p.28-32, 2018.

Agradecimento:

PROPPG
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

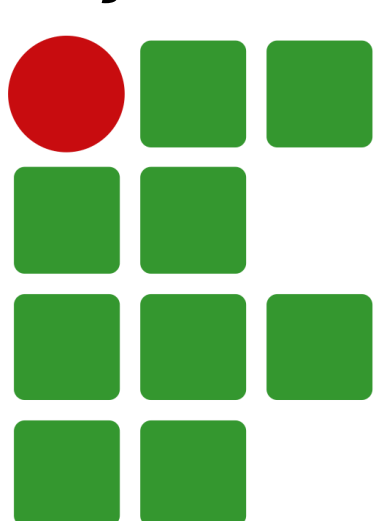
Laboratório de fertilização *in vitro*
Prof. Dr. Otávio Mito Ohashi

BONNETERRE
Tecnologia Rural
Energia Solar

Selo ODS

2 FOME ZERO
E AGRICULTURA
SUSTENTÁVEL

Organização:



INSTITUTO FEDERAL
Pará