

## **EFEITO DA ADIÇÃO DE CAFEÍNA E DA REDUÇÃO DO VOLUME DE MEIO DE FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* SOBRE A TAXA DE CLIVAGEM E TAXA DE BLASTOCISTO DE EMBRIÕES BOVINOS**

*Curcio, A.G.<sup>1</sup>, Micán, G.M.<sup>2</sup>, Paes de Carvalho, C.S.<sup>3</sup>, Narváez, H.J.<sup>4</sup>, Fontes, R.S.<sup>5</sup>,*

<sup>1</sup>UENF/ Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal, alinne\_gloria@hotmail.com

<sup>2</sup>UENF/ Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal, ginamican@hotmail.com

<sup>3</sup>UENF/ Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal carlapaes.carvalho@gmail.com

<sup>4</sup>UENF/ Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal javiernarvaezvet@gmail.com

<sup>5</sup>UENF/ Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal rfonte@uenf.br

**Resumo** – Avaliou-se o efeito da cafeína e da redução do volume de meio durante a fertilização *in vitro* de oócitos bovinos sobre a taxa de clivagem (D<sub>2</sub>) e de blastocisto no dia (D<sub>7</sub>). Oócitos maturados *in vitro* (TCM-199+SFB+LH+FSH e penicilina/estreptomicina) foram fertilizado em gotas de 40µl e 100µl de Talp-fert, acrescido ou não com cafeína 2mM em 4 grupos experimentais: Controle, G1 (40µl de meio de FIV sem cafeína), G2 (40µl de meio de FIV com cafeína) e G3 (100µl de meio de FIV com cafeína). O cultivo foi realizado em grupos de 20 zigotos em 100µL de fluído sintético do oviduto (SOF) a uma temperatura de 38,5° C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 7 dias. Para análise dos dados foi utilizado à análise de variância e comparação das médias pelo teste Duncan, com nível de significância de 5%. A taxa de clivagem dos grupos: controle, 1, 2 e 3 foram de 15,33±3,78, 13,67±2,7, 12,33 ±0,6, 10,67 ± 1,1, respectivamente. E a taxa de blastocisto para o grupo controle (5,33 ± 2,1), G1 (3,00 ± 0), G2 (2,33 ± 0,6) e G3 (4,00 ± 1,7). Conclui-se, que a adição de cafeína no meio de fertilização e a redução do volume da gota pode afetar as taxas de clivagem e blastocisto de embriões bovinos.

**Palavras-chave:** Produção *in vitro* de embriões, fosfodiesterase, Mini-gradiente descontínuo de percoll.

**Área de conhecimento** – Medicina Veterinária

### **Introdução**

Desde sua criação em 1978 pelos ingleses Robert Edwards e Patrick Steptoe, a fertilização *in vitro* (FIV) tem sido usada para estudar os processos de maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário. Um dos obstáculos na produção *in vitro* de embriões (PIV) bovinos, está relacionado com o baixo

número de oócitos fertilizados e o volume utilizado no meio de fertilização. Uma das ferramentas que estão sendo utilizadas para aumentar a taxa de fertilização está relacionado com a adição de cafeína no meio de FIV e redução do volume deste de modo que promova a concentração dos fatores de crescimento produzidos pelos gametas.

A cafeína é um inibidor da fosfodiesterase, substância que permite o aumento da concentração do AMP cíclico durante a capacitação espermática, modulando a adenilciclase e a reação acrossômica, induzindo a capacitação dos espermatozóides e a reação acrossômica, melhorando a penetração dos espermatozóides (NASCIMENTO, 2003).

O trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da cafeína e a redução do volume de meio de FIV sobre as taxas de clivagem e de blastocisto com a finalidade de estabelecer um novo protocolo para FIV.

### Metodologia

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes-RJ, no período de agosto de 2009 a abril de 2010. Os oócitos foram obtidos a partir de ovários de vacas de abatedouro da região de Campos, transportados até o laboratório em garrafas térmicas contendo solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%), acrescida de antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina).

Foram aspirados folículos com diâmetros entre 2 – 6 mm, com auxílio de uma seringa acoplada a uma agulha 19 “G” (40 x 1.2 mm). O líquido folicular recuperado foi colocado em tubos de 50 ml e após 10 minutos de decantação, o sobrenadante foi descartado e procedeu-se a seleção dos oócitos em meio de manipulação TCM-199 com sais de Earle, acrescido de 25 mM de Hepes e antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Foram obtidos um total de 200 oócitos e classificados como grau I e II de qualidade, contendo três ou mais

camadas de células do *cúmulus* e citoplasma uniforme. Todos os oócitos foram maturados em meio TCM-199 sem Hepes, suplementado com 10% de SFB, 10µg/ml de FSH, 10µg/ml de LH e antibióticos (penicilina/estreptomicina 1%, Nutricell®). Os oócitos foram mantidos em placas contendo gotas de 100µl de meio de maturação (20 ovócitos por gota), sob óleo mineral, por um período de 22 horas a 38,5°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Após 22 horas de maturação os CCO, foram separados aleatoriamente em 4 grupos experimentais.

Para todos os grupos foi utilizado o meio de fertilização (Talp-fert, Nutricell®). O grupo controle foi fertilizado em gota de 100µl sendo suplementado com heparina, o grupo 1 a FIV foi realizada em uma gota de 40µl de meio, o grupo 2 a FIV foi realizada em gota de 40µl sendo acrescida de 2mM de cafeína e o grupo 3 a FIV foi realizada em gota de 100µl com 2mM de cafeína. As gotas foram cobertas por óleo mineral em placa de Petri (35 x 10 mm). Foi utilizado sêmen congelado disponível comercialmente, de uma mesma partida, de reprodutores da raça Nelore, para todos os grupos experimentais. Os espermatozóides foram preparados segundo a técnica de mini-gradiente descontínuo de percoll (Nutricell®). A concentração espermática foi de  $1 \times 10^6$  espermatozóides/ml. Os supostos zigotos foram incubados a uma temperatura de 38,5° C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 18 h. A avaliação da taxa de clivagem foi procedida no segundo dia após a fertilização (D<sub>2</sub>) e a taxa de produção de blastócitos foram avaliadas no sétimo dia (D<sub>7</sub>) de cultivo (SOF)

Foram feitas 3 repetições para todos os grupos experimentais e para a análise dos dados foi utilizado a análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias pelo teste Duncan, com nível de significância de 5%.

## Resultados

De acordo com a análise dos dados não houve diferença significativa na taxa de clivagem do grupo controle (15,33±3,78) em relação aos grupos 1 e 2 (13,67±2,7, 12,33±0,6, respectivamente). E quando comparado o grupo controle (15,33±3,78) com o grupo 3, foi possível observar diferença significativa (10,67±1,1). Esta diferença entre o grupo controle e G3, demonstra uma redução da taxa de clivagem quando adicionada cafeína ao meio de fertilização (Tabela 1) em volume utilizado convencionalmente nos protocolos de FIV.

**Tabela 1. Valores médios e desvio padrão da taxa de clivagem e produção de blastocistos, fertilizados em volumes reduzidos de meio com e sem cafeína.**

Trat.	Oócitos avaliados	Clivagem (D <sub>2</sub> )	Blastocisto (D <sub>7</sub> )
C	53	15,33±3,78 <sub>a</sub>	5,33 ± 2,1 <sub>a</sub>
G1	50	13,67±2,7 <sup>a</sup>	3,00 ± 0 <sup>ab</sup>
G2	48	12,33 ± 0,6 <sup>ab</sup>	2,33 ± 0,6 <sub>b</sub>
G3	49	10,67 ± 1,1 <sup>b</sup>	4,00 ± 1,7 <sub>ab</sub>

Em relação à taxa de blastocisto no dia 7, os resultados demonstraram maior taxa de blastocisto do grupo controle (5,33±2,1) quando comparado o grupo 2 (2,33±0,6). No entanto, não foi observado diferença entre o grupo

controle (5,33±2,1) e os grupos 1 e 3 (3,00±0 e 4,00±1,7).

## Discussão

A obtenção de um maior número de embriões produzidos *in vitro* com melhor qualidade vem sendo objetivo de inúmeras linhas de pesquisa. Porém, apesar do progresso realizado na otimização dos sistemas de cultura para maturação, fertilização e produção de embriões *in vitro*, apenas cerca de 40% dos oócitos obtidos de ovários de matadouros alcançam o estágio de desenvolvimento até blastocisto. Essas baixas taxas são influenciadas por vários fatores que atuam durante cada uma das etapas do processo *in vitro* (Viana, 2009).

A possibilidade da redução do volume de meio durante a fertilização *in vitro*, busca concentrar os diferentes fatores de crescimento produzidos pelos embriões nas horas iniciais após a FIV, além de reduzir o espaço físico entre os gametas, fato que seria importante, por exemplo, na FIV com sêmen sexado já que este tipo de sêmen já vêm com uma concentração reduzida de espermatozoides, otimizando o uso do material genético dos touros nos programas de produção *in vitro* de embriões. Brum et al., 2004, observou que não houve efeito da interação entre o número de oócitos e volume de meio.

Miao et al., 2007, observaram que a adição de cafeína no meio de maturação de oócitos de camundongos, diminuiu significativamente as taxas de maturação, sendo os oócitos de camundongos susceptíveis aos efeitos deletérios da cafeína sobre a inibição da maturação.

Segundo, Momozawa et al., 2003, a cafeína não é essencial no meio de fertilização *in vitro* de oócitos bovinos, sendo recomendada como substância promotora da capacitação dos

espermatozoides melhorando assim, a taxa de penetração espermática.

Tatham et al., 2003, concluíram que o efeito da cafeína está relacionado com a capacitação dos espermatozoides em programas de FIV na espécie bovina e bubalina, com decréscimo no desenvolvimento embrionário.

Estudo mais recente, observaram que a adição da cafeína em meio de fertilização de oócitos de ovinos reduz a polispermia e retém a habilidade para o desenvolvimento até o estágio de blastocisto (Maalouf, et al, 2009).

### Conclusão

O presente trabalho conclui que a adição de cafeína no meio de fertilização e a redução do volume da gota podem afetar a taxa de clivagem e taxa de blastocisto de embriões bovinos produzidos *in vitro*. A adição de cafeína ao meio de FIV, diminui as taxas de clivagem de embriões em D<sub>2</sub>, de igual modo a redução do volume de meio e a adição de cafeína diminuem significativamente as taxas de blastocitos no sétimo dia de desenvolvimento.

### Referências

BRUM, D.S.; LEIVAS, F.G.; NOEBAUER, M.R.; BERNARDI, M.L.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B. Volume de meio e número de oócitos para a fecundação na produção *in vitro* de embriões bovinos. **Veterinary Science** v. 9, n. 2, p. 61-66, 2004.  
MAALOUF, W.E; Lee, J.-H, CAMPBELL, K.H.S. Effects of caffeine, cumulus cell removal and aging on polyspermy and embryo development on *in vitro* matured and fertilized ovine oocytes. **Theriogenology** 71 (2009) 1083–1092.

Yi-Liang Miao <sup>a,b</sup>, Li-Hong Shi <sup>a,b</sup>, Zi-Li Lei <sup>a,b</sup>, Jun-Cheng Huang <sup>a,b</sup>,

Ji-Wen Yang <sup>a,b</sup>, Ying-Chun OuYang <sup>a</sup>,

Qing-Yuan Sun <sup>a,\*</sup>,

Da-Yuan Chen

MIAO, Y.; SHI, L.; LEI, Z.;HUANG, J.; YANG, J.; OUYANG, Y.; SUN, Q.; CHEN, D. Effects of caffeine on *in vivo* and *in vitro* oocyte maturation in mices. **Theriogenology** 68 (2007) 640–645.

MOMOZAWA, KENJI E FUJUDA, YOSHINORI. Caffeine in Fertilization Medium Is Not Essential for Bovine IVF by Fully Capacitated Spermatozoa. **Journal of reproduction and development**, Vol 49, No. 6, 2003.

NASCIMENTO, ANÍBAL BALLAAROTTI. Efeito da água de coco e BTS associados à cafeína na capacitação espermática *in vitro* em suínos. Fortaleza, 2003. (Mestrado em Ciências Veterinárias), Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Estadual do Ceará (UECE).

TATHAM, B. G., FEEHAN, T., PASHEN, R. Buffalo and cattle hybrid embryo development is decreased by caffeine treatment during *in vitro* fertilization. **Theriogenology** 59 (2003) 709 – 717.

VIANA, K. S. Morfologia e bioquímica dos efeitos do óxido nítrico na maturação de oócitos bovinos *in vitro*. *Campos dos Goytacazes, 2009 (Doutorado em Ciência Anima, Cento de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).*