

Efeito das células epiteliais do oviducto bovino (BOEC) na capacidade fertilizante dos espermatozóides *in vitro*

Vasques, M.I.; Baptista, M.C.; Pereira, R.M.; Marques, C.C.; Horta, A:E.M.

*Departamento de Reprodução Animal, Estação Zootécnica Nacional - INIA
2000-763 Vale de Santarém; <dfra.ezn@telepac.pt>*

Pretendeu testar-se o efeito de diferentes estratégias de fertilização na produção *in vitro* de embriões bovinos. Utilizaram-se BOEC oriundas de oviductos na fase folicular do ciclo para a capacitação dos espermatozóides (SPZ) após o swim-up, com ou sem meio de fertilização (meio Talp suplementado com heparina, penicilamina, hipotaurina e epinefrina).

O sémen bovino foi descongelado e submetido a um processo de swim-up. Os oócitos maturados foram divididos em 4 grupos: testemunha - fertilização em gotas (40 μ L) de meio fertilização (n=334); BOEC+SPZ - fertilização em gotas (100 μ L) de meio de cultura de embriões (TCM199+10% soro bovino) com BOEC e onde os SPZ se encontravam em incubação prévia durante 1 a 4 horas (n=329); BOECFERT+SPZ - fertilização em gotas (100 μ L) de meio de fertilização com BOEC e onde os SPZ se encontravam em incubação prévia durante 1 a 4 horas (n=320) e FERTves - fertilização em gotas (40 μ L) de meio fertilização com vesículas BOEC (n=329). Os presumíveis zigotos, 22 horas após a inseminação dos oócitos, foram transferidos para o sistema de co-cultura com BOEC. Foi avaliada a viabilidade dos SPZ pós swim-up, 1-4 horas pós incubação com BOEC e 22h após a inseminação dos oócitos por coloração vital (azul tripan a 0,4%).

A viabilidade dos SPZ 1 a 4 horas pós incubação com BOEC em meio de fertilização foi superior à da viabilidade em meio de embriões, situação que se inverte às 22 horas. A taxa de clivagem do grupo BOEC+SPZ foi significativamente ($P<0,0001$) inferior à dos outros grupos. As diferentes estratégias de fertilização utilizadas repercutiram-se posteriormente nas taxas de embriões D7 e D8 apresentando o grupo BOECFERT+SPZ mais embriões nestes dias que os grupo BOEC+SPZ e testemunha ($P=0,02$ e $P=0,08$, respectivamente).

Conclui-se que a presença das BOEC durante a capacitação dos SPZ e fertilização dos oócitos é benéfica para a produção *in vitro* de embriões bovinos, desde que utilizado o meio de fertilização referido.

Effect of bovine epithelial oviduct cells (BOEC) on *in vitro* fertilizing ability of bull spermatozoa

Vasques, M.I.; Baptista, M.C.; Pereira, R.M.; Marques, C.C.; Horta, A:E.M.

*Departamento de Reprodução Animal, Estação Zootécnica Nacional - INIA
2000-763 Vale de Santarém; <dfra.ezn@telepac.pt>*

The influence of different *in vitro* fertilization procedures on bovine embryo production was studied. Bovine oviduct epithelial cells collected from follicular phase of the cycle were used to incubate spermatozoa (SPZ) after the *swim up* procedures, with or without fertilization medium (modified Tyrodes medium supplemented with heparin, penicillamine, hipotaurine and epinephrine).

Frozen semen was thawed and capacitated in modified Tyrodes medium supplemented with caffeine for 60 minutes at 38,5°C. After maturation, oocytes were randomly allotted into four groups, followed by fertilization in 40µL droplets of fertilisation medium (CONTROL, n=334); in 100µL droplets of culture medium (TCM 199 supplemented with 10% oestrus cow serum) with BOEC monolayers previously incubated with spz for 1 to 4 hours (BOEC+SPZ, n=329), in 100µL droplets of fertilization medium with BOEC monolayers previously incubated with spz for 1 to 4 hours (BOECFERT+SPZ, n=320) and in 40 µl droplets of fertilization medium with BOEC vesicles (FERTves, n=329). Presumptive zygotes were transferred to BOEC monolayers at 22 hours after insemination for further development. Post-*swim-up* semen viability, 1 to 4 hours post-incubation in BOEC and at 22 hours post-insemination (pi), was assessed by tripan blue vital stain (0,4%).

Semen viability 1 to 4 hours post-incubation in BOEC with fertilisation medium was higher than viability in culture medium, but this pattern was reversed at 22 hours pi. Cleavage rate in BOEC+SPZ was significantly lower than in all other groups (P<0.0001). Different fertilisation protocols further influenced embryo rate production. Day 7 and D8 embryo production was higher in BOECFERT+SPZ than in BOEC+SPZ or CONTROL groups (P=0.02 and P=0.08, respectively).

In conclusion, spermatozoa capacitation and oocyte fertilisation in the presence of BOEC have beneficial effects on *in vitro* bovine embryo production, providing fertilisation medium is used.