

Implementação em Portugal da técnica de fertilização *in vitro* em ovinos

Baptista, M.C.; Marques, C.C.; Vasques, M.I.; Pereira, R.M.; Barbas, J.P. e Horta, A.E.M.

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

Pretendeu-se implementar a técnica de fertilização *in vitro* (IVF) em ovinos utilizando sémen congelado de carneiros das raças Merino e Serra da Estrela desde 2000.

Recolheram-se no matadouro local de Santarém (Santacarnes), 1563 ovários de fêmeas ovinas de idade igual ou inferior a 1 ano dos quais se aspiraram 4535 oócitos (265 ovários em 2000 dos quais foram recolhidos 561 oócitos, 896 durante 2001 dos quais se aspiraram 2712 oócitos e 402 ovários em 2002 fornecendo 1262 oócitos). Para a fertilização *in vitro* o sémen, proveniente de dois métodos de congelação, foi sujeito a um processo de capacitação pelo método de *swim-up* (meio de Brackett e Olliphant + 20% de soro de ovelha em cio). Os oócitos maturados *in vitro* foram inseminados usando uma concentração de 1×10^6 spz mL⁻¹. No suporte ao desenvolvimento embrionário foram utilizados dois sistemas de co-cultura, células da granulosa e células BOEC (células epiteliais de oviducto bovino). A taxa de clivagem foi determinada 48 horas após a inseminação e o desenvolvimento embrionário acompanhado até aos 12 dias.

A taxa média de recolha do oócitos por ovário foi de 2,12 para o ano de 2000, 3,03 em 2001 e 3,13 em 2002 (média: 2,8 oócitos por ovário). A taxa global de maturação (oócitos maturados/oócitos cultivados) foi de 67,9% (1º ano: 64,5%; 2º ano: 64,3%; 3º ano: 74,9%). A mobilidade individual média do sémen após o *swim-up* foi de 5,7% com o pior método de congelação do sémen (2000), ascendendo para 35,1% após modificações nas rampas de congelação do sémen e alterações nos meios de capacitação a partir de 2001. Após *swim up*, o índice de aglutinação e a mobilidade individual espermáticos mostraram uma correlação significativa ($r=0,67$; $P<0,001$). Em 2001, as melhorias qualitativas observadas nos spz permitiram passar da ausência total de clivagem para valores de 23,2% (22,1% no sistema de co-cultura com células da granulosa e de 25% no sistema de cultura BOEC) e 48,2% em 2002 (co-cultura de granulosa). Em 2001 obtiveram-se embriões em D8 em apenas 3 sessões com taxas de 30,4%, 6,5% e 27,3%. Numa destas sessões obtiveram-se 6 embriões extrusados em D10, sendo 4 na co-cultura com BOEC e 2 na co-cultura com células da granulosa. Em 2002, obtiveram-se em D7 sessenta mórulas em 8 de 9 sessões (15,9%) e em D8 dezoito blastocistos (6,1%) em 4 de 9 sessões.

Os resultados mostram que a taxa de maturação de oócitos ovinos é aceitável e que a fertilização *in vitro* depende da utilização de sémen congelado com boa qualidade. As taxas de clivagem melhoraram ao longo do tempo, e as de embriões são promissoras, mostrando ser ainda necessário identificar e corrigir factores que estão na origem da variabilidade entre sessões.

Implementation of ovine *in vitro* fertilization technique in Portugal

Baptista, M.C.; Marques, C.C.; Vasques, M.I.; Pereira, R.M.; Barbas, J.P. e Horta, A.E.M.

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

Since 2001, the *in vitro* fertilization technique (IVF) was implemented in our laboratory using frozen semen from Merino and Serra da Estrela rams.

A thousand and five hundreded sixty-three ovaries were collected from young female ewes with less than one-year age which supplied 4535 oocytes (265 ovaries and 561 oocytes in 2000; 896 ovaries in 2001 and 2712 oocytes; 402 ovaries and 1262 oocytes in 2002), were collected at a local abattoir. Thawed semen (1×10^6 spz mL⁻¹), frozen by two different methods, was used to fertilize matured oocytes after a swim up procedure (Brackett and Olliphant medium + 20% of ewe estrous serum). Cleavage rates were determined 48 h after insemination. Granulosa and bovine oviduct epithelial cells (BOEC) were used to support embryo development during 12 days.

Each ovary supplied an average of 2.12 oocytes in 2000, 3.03 in 2001 and 3.13 in 2002 (mean: 2.8 oocytes/ovary). The global oocyte maturation rate (matured/cultured) was 67.9% (64.5%, 64.3% and 74.9% for 2000, 2001 and 2002, respectively). Sperm motility after swim up was 5.7% with the worst freezing method (2000), rising up to 35.1% after introducing changes in semen freezing and capacitation medium (2001). After swim up, sperm agglutination index and sperm motility were highly correlated ($r=0,67$; $P<0,001$). The improvements observed in sperm quality during 2001 allowed growing from null cleavage rates to 23.2% (22.1% with granulosa and 25% with BOEC co-culture) and 48.2% in 2002 (only granulosa co-culture). D8 embryos were achieved only in 2001 culture sessions with rates of 30.4%, 6.5% and 27.3%. At one of these sessions 6 extruded embryos were obtained in D10 (4 with BOEC and 2 with granulosa co-cultures). In 2002, sixty D7 morulae in 8 out of 9 sessions (15.9%) and eighteen D8 blastocysts in 4 out of 9 sessions (6,1%) were obtained.

Results show that ovine oocyte maturation rate is acceptable and that IVF depends on using frozen semen with good quality. Cleavage rates improved with time and experience, and D8 embryo rates are promising in spite of a few number of sessions succeeding. It urges to identify and correct factors underlying on the accounted variation in embryo production.