



DESENVOLVIMENTO DE UM EMBRIÃO EM AMBIENTE ARTIFICIAL¹

EMBRYO DEVELOPMENT IN AN ARTIFICIAL ENVIRONMENT

Gabriel Pivato Alves²; Celso Grigoletti³

Resumo

A pesquisa consistiu na transferência de embriões de galinhas para uma cápsula artesanal com antimicrobiano e lactato de cálcio, somado ao fornecimento de oxigênio e umidade, e assim foi possível desenvolver uma técnica com resultados iniciais satisfatórios. A criação de uma incubadora artesanal para aumentar a umidade e diminuir a densidade de cápsulas em um mesmo ambiente foi uma opção a ser testada para suprir possíveis déficits. Os resultados foram promissores havendo desenvolvimento eficaz, embora os embriões não alcançaram o desenvolvimento completo. Por meio da realização dos experimentos houve a possibilidade de desenvolver habilidade em manipulação embrionária, sendo um fator determinante para a evolução do projeto. Foi possível afirmar que com a aplicação dessa metodologia houve um importante avanço inicial desta pesquisa.

Palavras-chave: Embrião. Incubação artificial. Desenvolvimento embrionário.

Introdução

O aumento da população mundial afeta diretamente a demanda de proteína de origem animal, sendo o frango um dos principais animais na cadeia alimentar. O Brasil possui uma grande fatia do mercado produtor dessa proteína, e as exportações brasileiras de carne de frango (considerando todos os produtos, entre *in natura* e processados) totalizaram 1,365 milhão de toneladas no primeiro quadrimestre de 2020 (ABPA, 2020). A necessidade do desenvolvimento tecnológico é evidente para aumentar, de forma eficiente, a produção dessa proteína. A técnica de desenvolvimento embrionário de aves fora do ovo, permite a evolução de diversos campos de pesquisas em diferentes áreas como a genética molecular, biologia celular, angiogênese, farmacologia entre outros. O sistema de cultura extra casca deve provar ser amplamente aplicável à manutenção e geração de aves manipuladas para estudos básicos e aplicados (KATO, 2013). Além disso, o uso de um filme plástico transparente permite não só a fácil observação da morfologia embrionária de todos os ângulos, mas também o fácil acesso ao embrião para manipulação (TAHARA e OBARA, 2014). Este método facilita a geração de galinhas transgênicas e outras manipulações embrionárias, que são necessárias para estudos em medicina regenerativa. Poderia também apoiar na cultura de tecidos, em estudos usando células tronco embrionárias aviárias e na produção em massa de ovos de galinha como biorreatores vivos (TAHARA e OBARA, 2014). O presente estudo propõe o desenvolvimento de embriões com o intuito de aprimorar as técnicas de criação extra ovo, seguindo

¹ Projeto de Iniciação Científica – PIIC - UTP

² Acadêmico de Medicina Veterinária, pesquisador PIIC - UTP

³ Professor orientador – PIIC - UTP; celso.grigoletti@utp.br

o modelo de Tahara e Obara (2014). O principal desafio foi a manipulação dos embriões e controle de umidade e oxigenação. Com isso, houve a necessidade de criar alternativas como a construção de uma incubadora artesanal visando melhorar esses fatores para buscar novos resultados.

Material e Métodos

Os ovos do estudo foram obtidos por meio de doação de granjas particulares, provenientes de diferentes locais em cada experimento. Em toda a pesquisa foram utilizados ovos galados do tipo vermelho, advindos de galinhas “caipiras”.

O meio de cultura foi criado com algumas adaptações como um Becker plástico (Figura 1), que foi moldado para obter um volume interno máximo de 400 mL. As outras especificações foram realizadas de acordo com o descrito por Tahara e Obara (2014). Na lateral do Becker a 2 cm de distância do fundo, foi aberto um orifício de 1 cm de diâmetro, coberto por algodão que serviu como filtro. Atravessando o algodão foi inserido um tubo plástico de 2 mm para o fornecimento de oxigênio no interior da cápsula. Ao interior do Becker foi adicionada uma solução aquosa de 40 mL de Cloridrato de Benzalcônio a 0,01%. Um filme de plástico foi colocado de modo a cobrir a boca do copo, e utilizou-se um ovo para imprimir sua forma no filme, assim adequando-o ao seu formato original. Dentro dessa moldura foram adicionadas 250 mg de lactato de cálcio penta-hidratado em pó e acrescentou-se em 2,5 mL de água destilada. Os ovos foram limpos com álcool a 70% antes de serem quebrados e seu conteúdo transferido para a cápsula. Após a transferência, foram produzidos 10 furos de 5 mm para ventilação no limite superior próximo a borda do Becker na superfície do filme (TAHARA e OBARA, 2014). Por último o recipiente de cultura foi coberto por um plástico, como uma tampa, para manter a umidade dentro do recipiente. A movimentação das cápsulas no primeiro experimento foi atribuída a incubadora específica para ovos, que era automática, não necessitando o contato direto com as cápsulas após o início da incubação.

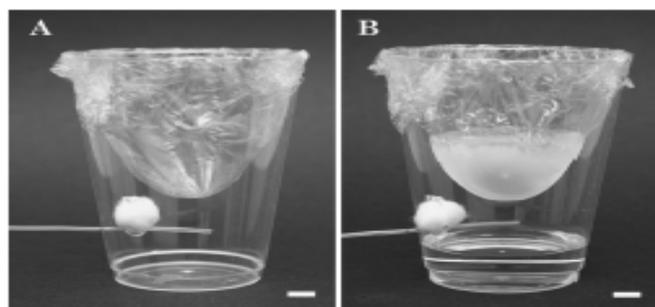
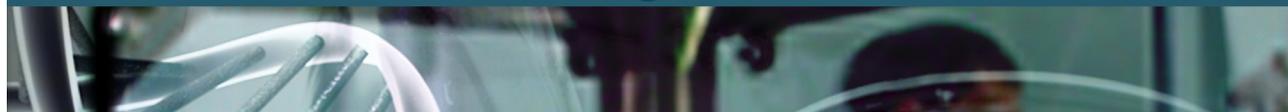


Figura 1 – Becker plástico, embalagem adaptada para desenvolvimento do embrião

O objetivo dessa incubadora foi aumentar a umidade específica do ambiente de 50-60% para 80-90%. A construção seguiu o que foi descrito por Peralta (2013), com várias adaptações. Foi utilizado um recipiente a base de isopor isotérmico com tampa e medidas externas de 47 cm x 37,5



cm x 41 cm e volume interno de 45 litros. Dentro dele foi adicionado um recipiente metálico refletivo com medidas externas de 34,5 cm x 24,7 cm x 4,8 cm e 4 litros de volume interno, preenchido com água. Logo acima do recipiente, foi posicionada uma grade de 35,5 cm x 25,5 cm. Para o aquecimento utilizou-se uma lâmpada halógena de 70 Watts (W), ligada a um bocal fixado à tampa da incubadora. A partir desse bocal uma fiação elétrica passava por um potenciômetro operando a 127 Volts com potência máxima de até 100 W, ligado em um plug macho de 10 Amperes conectado à rede elétrica. Na aferição da temperatura e umidade utilizou-se um termômetro híbrido que avaliava as duas grandezas.

Resultados

Foram realizados dois experimentos. No primeiro foram utilizados 6 ovos fertilizados, conferidos por ovoscopia. A pré-incubação ocorreu durante 55 h na temperatura de 38°C e 55 % de umidade em uma incubadora específica para ovos. 50% dos ovos demonstraram desenvolvimento satisfatório, porém sua viabilidade durou até o segundo terço do período de incubação, e encerrou-se no 8º dia. No segundo experimento, foram adotadas algumas medidas em busca de novos resultados, sendo feita a divisão em dois grupos, na tentativa de reduzir o número de cápsulas no mesmo ambiente para melhor oxigenação do meio. Outra medida foi a criação de uma incubadora artesanal, buscando um aumento na umidade relativa do ambiente. Foram pré-incubados e utilizados 8 ovos, divididos em 50% no grupo A e o restante no grupo B. O grupo A foi incubado por 55 h e colocado na incubadora artesanal em uma temperatura variável de 37,8-38,2°C com umidade de 80-90%. O grupo B foi incubado por 65 h e colocados na incubadora específica para ovos à temperatura de 38°C com umidade de 50-60%. Ambos os grupos apresentaram o mesmo resultado, não havendo desenvolvimento significativo nesse experimento.

Discussão

No primeiro experimento, 100% dos ovos foram identificados como fecundados por ovoscopia, porém, apenas em 50% houve desenvolvimento efetivo, confirmando os resultados obtidos por Tahara e Obara (2014). O tempo de incubação foi efetivo, tendo em vista que houve um desenvolvimento embrionário satisfatório, observando-se que os 8 primeiros dias da cultura são cruciais para a evolução do experimento. O período de pré-incubação até a transferência bem-sucedida dos embriões para o recipiente de cultura influencia na viabilidade até o 8º dia da cultura, bem como a transferência bem-sucedida do embrião para o meio (TAHARA e OBARA, 2014). As razões que levaram a falha do primeiro experimento podem estar ligadas com a fase de transferência, uma vez que o período de pré-incubação foi realizado corretamente. Na fase de transferência o fator que pode ter afetado o resultado final foi a presença de rugosidades no plástico filme. Na fase de incubação a baixa umidade, a baixa oxigenação e a hipercalemia podem ter colaborado



para o resultado obtido. A baixa oxigenação pode ser confirmada pelo aparente escurecimento dos vasos sanguíneos que ocorreu antes do previsto, no dia 17, evidenciando hipóxia. A umidade recomendada para o período de incubação é de 80% dentro da incubadora e próximo a 100% dentro da cápsula. Na tentativa de aumentar a umidade dentro da cápsula, foram adicionados 3 mL de água destilada junto ao lactato de cálcio, sugerindo que pode causar um desequilíbrio eletrolítico e hipercalcemia (TAHARA e OBARA, 2014). No segundo experimento, houve a separação em dois grupos, A e B, para corrigir os problemas descritos anteriormente. O grupo A foi disposto dentro da incubadora experimental com maior umidade, e o grupo B dentro da incubadora específica para ovos. Cada uma recebeu quatro ovos na intenção de diminuir a densidade de cápsulas dentro do mesmo ambiente para evitar a baixa oxigenação. No grupo B, durante a transferência do ovo para a cápsula, houve dano na membrana vitelina em 2 ovos. O dano pode ser explicado pelo longo período de incubação, que nesse grupo foi de 65 h, e ocorreu durante a quebra da casca em ovos que ficaram mais de 60 h na pré-incubação (TAHARA e OBARA, 2014).

Conclusões

Os experimentos reproduzidos e adaptados foram os primeiros passos para obtenção de novos resultados nessa linha de pesquisa. Embora não tenha sido possível alcançar o resultado desejado, com o desenvolvimento completo dos embriões, foi considerada satisfatória a aplicação da técnica como um grande avanço inicial. Este experimento poderá ser desenvolvido para evolução de novas pesquisas, possibilitando aperfeiçoar o desenvolvimento da técnica e das tecnologias a ela associadas.

Referências

ABPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. Exportações de carne de frango mantém alta de 5,1% em 2020. São Paulo, 2020. Disponível em: <<http://abpa-br.org/exportacoes-de-carne-de-frango-mantem-alta-de-51-em-2020/>>. Acesso em: 14/05/2020.

KATO, A. Culture system for bobwhite quail embryos from the blastoderm stage to hatching. *Journal of Poultry Science*, 50: 155-158. 2013. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpsa/advpub/0/advpub_0120131/_article/-char/ja/> Acesso em: 09/05/2020.

PERALTA, C. B. L. Processo de Desenvolvimento de Produto para uma Incubadora de Ovos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GESTÃO DE DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS, 9, 2013, Natal. Disponível em: http://www.researchgate.net/profile/Evelise_Ferreira/publication/306375336_processo_de_desenvolvimento_de_produto_para_uma_incubadora_de_ovos/links/57bba83508ae51eef1f3d56f/ Acesso em: 15/05/2020.

TAHARA, O.; OBARA, K. A Novel Shell-less Culture System for Chick Embryos Using a Plastic Film as Culture Vessels, in *J. Poult. Sci.*, 51: 307-312, 2014. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpsa/advpub/0/advpub_0130043/_article/-char/ja/>. Acesso em: 09/05/2020.