

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS APÓS A MANUTENÇÃO DOS
OÓCITOS EM LÍQUIDO FOLICULAR EQUÍNO OU BOVINO**
**(*In vitro* bovine embryo production after maintaining the oocytes in equine
or bovine follicular fluid)**

PINTO, M.G.L.¹; RUBIN, M.I.B.²; SILVA, C.A.M.²; BERNARDI, M.L.³;
PILLA, L.F.C.⁴; DEZEN, D.⁴; SCHLESTEIN, A.⁴

¹Médico Veterinário;

²Embryolab, DCGA, CCR, UFSM, 97.105-900 Santa Maria, RS. embriao@www.ufsm.br;

³Departamento de Zootecnia, UFRGS, 91.540-000 Porto Alegre, RS;

⁴Bolsista de Iniciação Científica do Embryolab, DCGA, CCR, UFSM, Santa Maria, RS. embriao@www.ufsm.br.

RESUMO – Foi avaliada a viabilidade de utilização do líquido folicular equino (LFe) na manutenção de oócitos bovinos, antes da maturação, foi avaliada utilizando-se 1228 complexos cumulus-oócitos (CCOs), de ovários coletados em abatedouro. Os CCOs foram distribuídos em 4 tratamentos com 13 repetições cada. No grupo T1 e T2, os oócitos foram maturados *in vitro* (MIV) por 24 e 18h, respectivamente. Os CCOs dos T3 e T4 foram expostos por 6h a 30°C ao LFe e ao Líquido Folicular bovino (LFb), respectivamente, e maturados por 18h. Para a MIV utilizou-se o meio TCM 199. A fecundação *in vitro* (FIV) foi realizada em meio Talp-Fert. A MIV e a FIV foram realizadas em estufa de cultivo a 39°C com 5% CO₂ em ar e umidade saturada. Os zigotos foram cultivados em meio SOFaaci, sob óleo mineral, em placas de quatro poços, no interior de bolsas plásticas gaseificadas com 90%N₂, 5%O₂ e 5%CO₂. A taxa de clivagem foi menor para os oócitos maturados por 18h, em comparação aos maturados por 24h (P<0,05). Não foram constatadas diferenças nas taxas de blastocistos em D7 e de eclosão em D9. Quando a maturação foi de 18h, a taxa de blastocistos em D9 foi superior nos oócitos previamente expostos ao LFb em comparação aos não expostos (P<0,05). Oócitos bovinos podem ser mantidos em LFe durante 6h, antes da MIV por 18h, resultando em taxas de desenvolvimento embrionário semelhantes às aquelas obtidas com a exposição ao LFb ou com a maturação por 24h.

Palavras chave: oócitos bovinos, fluido folicular equino, produção *in vitro*.

ABSTRACT – The viability of equine (eFF) or bovine (bFF) follicular fluid for holding bovine oocytes, before maturation, was evaluated using 1228 cumulus oocytes-complexes (COCs), from ovaries obtained in abattoir. COCs were distributed in 4 treatments with 13 replicates each. In T1 and T2 groups the oocytes were matured (IVM) for 24 and 18h, respectively. COCs from T3 and T4 groups were exposed, respectively, to eFF and bFF for 6h at 30°C, and matured for 18h. TCM-199 was used for IVM. *In vitro* fertilization (IVF) was performed in TALP-FERT medium. IVM and IVF were carried out in an incubator at 39°C with 5% CO₂ in air and saturated humidity. Zygotes were cultured in SOFaaci medium, under mineral oil, in four well dishes inside plastic bags gasified with 90%N₂, 5% O₂ e 5% CO₂. Cleavage rate of the oocytes matured for 18h was lower (P<0,05) than that observed with 24h of maturation. No differences were observed on blastocyst rates on D7 and hatching rates on D9 (P>0,05). When oocytes were matured for 18h, D9-blastocyst rates were higher with previous exposure to bFF (P<0,05). Bovine oocytes can be maintained in eFF for 6h prior to 18h-IVM, resulting in similar *in vitro* embryonic development rates compared to that obtained after bFF exposure or to maturation for 24h.

Key words: Bovine oocytes, equine follicular fluid, *in vitro* embryo production.

Introdução

No sistema de produção *in vitro* (PIV) de embriões, o período compreendido entre a recuperação dos oócitos e seu processamento no laboratório, assim como as condições de armazenamento durante o transporte afetam a sua capacidade de desenvolvimento (SCHWARTZ *et al.*, 1998). Diversos meios têm sido utilizados por quem explora comercialmente a aspiração folicular, sem comprometimento do desenvolvimento embrionário, seja para a manutenção ou para o transporte de oócitos. Entre eles estão o TCM-199, acrescido de Hepes ou bicarbonato (TWAGIRAMUNGU *et al.*, 1998; FRY *et al.*, 2000), o Tyrode Lactato acrescido de Hepes (SCHERNTHANER *et al.*, 1998), ou o PBS (KELLER *et al.*, 1993).

O líquido folicular bovino (LFb) tem sido benéfico tanto para a manutenção de oócitos (SCHNEIDER e RODRIGUES, 1997; LEHMKUHL *et al.*, 2000; VIZCARRA *et al.*, 2000), como para a maturação *in vitro* e desenvolvimento embrionário posterior (ROMERO e SEIDEL, 1994; SUN *et al.*, 1994; OCAÑA QUERO *et al.*, 1994; SIRARD *et al.*, 1995; ELMILEIK *et al.*, 1995; KIM *et al.*, 1996).

FIGUEIRÓ *et al.* (2000) demonstraram a viabilidade da utilização do soro de égua em estro na PIV de embriões bovinos. A utilização de líquido folicular eqüino (LFe) poderia prevenir a infecção dos oócitos por agentes espécie-específicos (STRINGFELLOW, 1998), mas seu uso na PIV de embriões bovinos não tem sido relatado.

No presente trabalho, foi investigada a viabilidade de utilização do LFe, em comparação ao LFb, para a manutenção de oócitos bovinos, antes de sua maturação e fecundação *in vitro*.

Material e Método

Ovários eqüinos obtidos em frigorífico tiveram os folículos com diâmetro entre 5 a 35mm puncionados com o auxílio de bomba de vácuo. Formou-se um *pool* do líquido folicular, que foi centrifugado por

10 minutos a 1000g. O sobrenadante foi depositado em tubos e estocado a -20°C . O líquido folicular bovino foi obtido pelo mesmo procedimento, porém de folículos ovarianos com 2 a 8mm de diâmetro.

Os oócitos foram obtidos de ovários provenientes de vacas abatidas em frigorífico. Estes foram transportados à temperatura de 30°C em solução fisiológica de NaCl a 0,9% acrescida de estreptomicina e penicilina G-Potássica, num período não superior a duas horas após o término do abate. Os oócitos foram mantidos em líquido folicular para a procura sob lupa estereomicroscópica.

Os oócitos foram selecionados de acordo com o critério descrito por De LOOS *et al.* (1989). Os CCOs de qualidade I e II foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de 20 a 30 oócitos constituindo os seguintes tratamentos: T1, T2, T3 e T4. Os CCOs dos grupos T1 e T2 não foram expostos a líquido folicular, sendo colocados para maturação *in vitro*, por 24 e 18 horas, respectivamente.

Os CCOs dos grupos T3 (LFe) e T4 (LFb) foram depositados em $400\mu\text{l}$ de líquido folicular correspondente, em tubos de poliestireno, envoltos por papel alumínio e mantidos em banho-maria por 6 horas a 30°C .

Os oócitos dos grupos T1 e T2, logo após a seleção, foram lavados com meio TCM-199, adicionado de HEPES e 10% de soro de vaca em estro. Após, os oócitos foram transferidos para o meio de maturação (TCM-199 com 10% de soro de vaca em estro, rFSHh e LHe) permanecendo por 24 horas (T1) e 18h (T2) em estufa de cultivo, a 39°C , com 5% de CO_2 em ar e umidade saturada.

Os oócitos dos tratamentos T3 e T4 foram recuperados após o período de 6h em líquido folicular, lavados e submetidos às mesmas condições de maturação utilizadas para os grupos T1 e T2, porém com período de 18h.

Após o período de MIV, os oócitos foram transferidos para gotas de $400\mu\text{l}$ de meio TALP-FERT (PARRISH *et al.*, 1986). Para a inseminação utilizou-se sêmen congelado de *Bos taurus*, cujos

espermatozoides foram selecionados por migração ascendente. Empregou-se uma concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL e a incubação dos gametas foi realizada em estufa de cultivo a 39°C, com 5% de CO₂ em ar, com umidade saturada, por um período de 18h.

Após o período de fecundação, os presumíveis zigotos foram liberados das células do *cumulus oophorus* por meio de agitador mecânico. Em seguida, os oócitos/zigotos foram transferidos para o meio SOFaaci (HOLM et al., 1999), onde permaneceram por 8 dias em gotas de 400µl, sob óleo mineral, em placas de cultivo de quatro poços. As placas foram mantidas no interior de sacos plásticos não permeáveis a gases com uma mistura de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂, em estufa de cultivo a 39°C.

Delineamento experimental e análise estatística: Os CCOs foram distribuídos em 4 tratamentos (T1, T2, T3 e T4),

conduzidos simultaneamente, com 13 repetições cada. Foram avaliadas as taxas de clivagem, de blastocistos em D7 e D9 e taxa de eclosão em D9, considerando a data da fecundação como D0.

Os dados foram analisados com o PROC GLM (SAS, 1998) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Resultados

As taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário podem ser visualizadas na TABELA 1. A taxa de clivagem foi menor nos oócitos maturados por 18h do que por 24h ($P < 0,05$). Não houve diferença nas taxas de blastocistos em D7 e de eclosão em D9 ($P > 0,05$). Para os oócitos maturados por 18h, houve um efeito benéfico ($P < 0,05$) da exposição ao LFb, com aumento dos blastocistos em D9.

TABELA 1 – PERCENTUAIS DE CLIVAGEM E DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* APÓS A FECUNDAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS MANTIDOS EM LÍQUIDO FOLICULAR EQUINO OU BOVINO.

Tratamentos	CCOs n	Clivagem	Embriões D7 Bi, Bl e Bx	Embriões D9 Bx, Bh, Be	Eclosão/D9
MIV por 24h	309	85,4 ^a	27,5 ^a	19,4 ^{ab}	51,7 ^a
MIV por 18h	298	77,8 ^b	21,1 ^a	12,7 ^b	47,4 ^a
6h em LFe; MIV por 18h	314	82,2 ^{ab}	22,6 ^a	19,4 ^{ab}	44,3 ^a
6h em LFb; MIV por 18h	307	81,1 ^{ab}	28,3 ^a	25,1 ^a	44,1 ^a

^{a,b} Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

Discussão

Os resultados obtidos confirmam a possibilidade da manutenção dos oócitos bovinos em LFb por períodos de 5 a 10 horas (SCHNEIDER e RODRIGUES, 1997; SCHWARTZ et al., 1998; LEHMKUHL et al., 2000; VIZCARRA et al., 2000), sem prejuízos ao desenvolvimento embrionário. No presente estudo, o LFe mostrou-se eficaz na PIV de embriões bovinos, visto que as taxas de clivagem, de blastocistos e de eclosão foram semelhantes às do grupo

de oócitos maturados por 24h e às do grupo cujos oócitos foram mantidos por 6h em LFb.

O grupo de oócitos maturados por 18h apresentou clivagem inferior ($P < 0,05$) e tendência ($P < 0,08$) a uma menor taxa de blastocistos em D9, em comparação ao grupo de oócitos que maturaram por 24h. De fato, WARD et al. (2002) evidenciaram que a duração ótima da maturação de oócitos bovinos para maximizar a produção de blastocistos é de 24h. No presente estudo, quando os oócitos foram mantidos previamente em LFb ou LFe,

mesmo se submetidos a 18h de MIV, alcançaram taxas de clivagem e de desenvolvimento em D7 e D9 semelhantes às do grupo com maturação por 24h. Isso demonstra que a manutenção de oócitos bovinos no LFe ou LFb permite que a maturação seja efetuada por um período inferior a 24h, sem comprometer o desenvolvimento embrionário.

DODE *et al.* (2000) mostraram que a presença de 80% de LFb, mesmo de folículos pequenos (1-2mm) é incapaz de inibir por completo a meiose, durante períodos de 12h ou mais. Após 24h de cultivo, o percentual de oócitos em vesícula germinativa não foi influenciado pela presença ou não de LFb. Neste contexto, cabe salientar que ELMILEIK *et al.* (1995) verificaram um efeito positivo no desenvolvimento embrionário com a inclusão de 10 ou 15% de LFb obtido de folículos maiores ou iguais a 15mm, no meio de maturação. Em contraste, a presença de LFb oriundo de folículos de 1 a 5mm, no meio de fecundação, diminuiu o percentual de fecundação e de blastocistos (CHOI *et al.*, 1998). Embora o mecanismo ainda não seja elucidado, parece que folículos maiores podem conter substâncias estimuladoras que promovem o potencial dos oócitos se desenvolverem até blastocistos, independentemente de afetar ou não as taxas de maturação nuclear. Tanto em bovinos como em eqüinos, o crescimento folicular está associado ao aumento dos níveis intrafoliculares de estradiol e a diminuição das proteínas de ligação do IGF (GÉRARD *et al.*, 1999; AUSTIN *et al.*, 2001; FORTUNE *et al.*, 2001), condições essenciais para que os folículos estabeleçam sua dominância sobre os subordinados. Assim, é provável que um efeito benéfico seja mais facilmente obtido com a manutenção dos oócitos em LF obtido de folículos de tamanho médio ou grande, ao invés de folículos pequenos.

O fato dos oócitos poderem ser mantidos em líquido folicular por 6h, seguidos de uma maturação por 18h, facilita o seu transporte do local de coleta por aspiração, de fêmeas doadoras vivas,

até o laboratório de PIV. Quanto ao fato de usar LFe ou LFb, pode-se considerar algumas vantagens do primeiro sobre o segundo. Por ser heterólogo, pode prevenir a transmissão de doenças espécie-específicas, passíveis de serem carreadas pelos diferentes materiais de origem protéica (STRINGFELLOW *et al.*, 2000). Por outro lado, pode-se obter sem dificuldade um grande volume de LFe, devido ao maior diâmetro dos folículos.

Conclusão

A manutenção de oócitos bovinos pode ser feita com sucesso em líquido folicular eqüino ou bovino por 6h a 30°C antes da sua maturação por 18h para a produção *in vitro* de embriões.

Referências

- AUSTIN E.J.; MIHM M.; EVANS A.C.; KNIGHT P.G.; IRELAND J.L.; IRELAND J.J.; ROCHE J.F. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. **Biology of Reproduction**, Madison, WI, v.64, n.3 p.839-848. 2001.
- CHOI, Y.H.; TAKAGI, M.; KAMISHITA, H.; WIJAYAGUNAWARDANE, M.P.B.; ACOSTA, T.J.; MIYAZAWA, K.; SATO, K. Effects of follicular fluid on fertilization and embryonic development of bovine oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, Los Altos, CA, v.49, n.6, p.1103-1112. 1998.
- De LOSS, de F.; Van VLIET, C.; Van MAURIK, P.; Th. A.M. KRUIP. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**, v.24, n.2, p.197-204, 1989.
- DODE, M.A.N.; ADONA, P.R.; RODOVALHO, N.C.M. Retenção da meiose de ovócios bovinos em líquido folicular de folículos de vários tamanhos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v.28, n.1, p.241, 2000.
- ELMILEIK, A.M.A.; MAEDA, T.; TERADA, T. Higher rates of development into blastocyst following the *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured in a medium supplemented with the fluid from large bovine follicles. **Animal Reproduction Science**, New, York, NY, v.38, 85-96, 1995.

- FIGUEIRÓ G.M.; BRUM, D.S.; MEZZALIRA, A.; FIALHO, S.S.; ALVES, M.R.L.; RUBIN, M.I.B.; SILVA, C.A.M. Soro eqüino na PIV de embriões bovinos: I. Uma análise do soro de égua em diferentes estágios do cio. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v.28, n. 1, p.258, 2000.
- FORTUNE J.E.; RIVERA G.M.; EVANS A.C.; TURZILLO, A.M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, Madison, WI, v.65, n.3, p. 648-654, 2001.
- FRY, R.C.; KELLY, J.M.; HARRIS, S.G.; EARL, C.R. No difference in embryo production from oocytes collected by ovum pick-up from commercial cows when using either hepes or bicarbonate-buffered IVM media. **Theriogenology**, New York, NY, CA, v.53, n.1, p.353, 2000.
- GÉRARD, N.; DUCHAMP, G.; MAGISTRINI, M. Relationships between follicular fluid composition and follicular/oocyte quality in the mare. **Livestock Production Science**, v.60, p.243-253, 1999.
- HOLM, P.; BOOTH, P.J.; SCHMIDT, M.H.; GREVE, T.; CALLESEN, T. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, New York, NY, v.52, n.4, p.683-700, 1999.
- KELLER, M.L.; OLSON, S.E.; SEIDEL Jr.; G.E. Storage of bovine oocytes in calcium-free medium for 1 hour markedly lowers *in vitro* fertilization and embryonic development. **Theriogenology**, New York, NY, v.39, n.1, p.243, 1993.
- KIM K.S.; MITSUMIZO N.; FUJITA K.; UTSUMI K. The effects of follicular fluid on *in vitro* maturation, oocyte fertilization and the development of bovine embryos. **Theriogenology**, New York, NY, v.45, n.4, p. 787-799, 1996.
- LEHMKUHL, R.C.; MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A.D.; PINTO, M.G.L.; FAVA, R.C.; SOARES, M.P.; THALER NETO, A.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B. Desenvolvimento de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular e submetidos a FIV. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v.28, n.1, p.276, 2000.
- OCAÑA QUERO J.M.; MORENO MILLÁN M.; VALERA CÓRDOBA, M.; RODERO FRANGANILIO, A. The influence of different types of media supplement on the meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, New York, NY, v.41, n.2, p.405-411, 1994.
- PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, New York, NY, v.25, n.2, p.591-600, 1986.
- ROMERO-ARREDONDO, A.; SEIDEL Jr. G.E. Effects of bovine follicular fluid on maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, New York, NY, v.41, n.2, p.383-394, 1994.
- SAS INSTITUTE (Cary NC). **SAS user's guide**: Statistical Analysis System, Release 6.12-1998.
- SCHERNTHANER, W.; WENIGERKIND, H.; BOXHAMMER, K.; JUNG, P.; STOJKOVIC M.; WOLF E. Storage of bovine oocytes after ultrasound guided follicle aspiration: Effects on developmental competence. In: REUNION OF ASSOCIATION EUROPEENNE DE TRANSFERT EMBRYONNAIRE, XIV, 1998, Venice, **Proceedings...**, 1998, p.242.
- SCHNEIDER, M.R.; RODRIGUES, J.L. Avaliação de sistemas de armazenamento de oócitos e embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v.25, n.2, p.133-136, 1997.
- SCHWARTZ, J.; SCHNEIDER, M.R.; RODRIGUES, J.L.; REICHENBACH, H-D. Effect of short-term storage of bovine oocytes in different media and temperatures on the subsequent *in vitro* embryo development. **Theriogenology**, New York, NY, v.49, n.1, p.217, 1998.
- SIRARD, M.A.; ROY, F.; PATRICK, B.; MERMILLOD, P.; GUILBAULT, L.A. Origin of the follicular fluid added to the media during bovine IVM influences embryonic development. **Theriogenology**, New York, NY, v.44, n.1, p.85-94, 1995.
- STRINGFELLOW, D.A. Recomendações para o manuseio sanitário de embriões obtidos *in vivo*. In: STRINGFELLOW, D.A., SEIDEL, S.M. **MANUAL DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES**, 2.ed., 1998, p.83-88.

STRINGFELLOW, D.A.; RIDDELL, K.P.; GALIK, P.K.; DAMIANI, P.; BISHOP M.D.; WRIGHT, J.C. Quality controls for bovine viral diarrhea virus-free IVF embryos. **Theriogenology**, New York, NY, v.53, n.3, p.827-839, 2000.

SUN, F.J.; HOLM, P.; IRVINE, B.; SEAMARK, R.F. Effect of sheep and human follicular fluid on the maturation of sheep oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, New York, NY, v.41, n.4, p.981-988, 1994.

TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; GUILBAULT, L.A.; SIRARD, M.A.; BOUSQUET, D. Media and time of oocytes transport influence their developmental competence for *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**, New York, NY, v.49, n.1, p.299, 1998.

VIZCARRA, V.E.L.; CAMARGO, L.S.A.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; VIANA J.H.M. Efeito do fluido folicular na manutenção de oócitos recém aspirados de bovinos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v.28, n.1, p.343, 2000.

WARD F.; ENRIGHT, B.; RIZOS, D.; BOLAND M.; LONERGAN, P. Optimization of *in vitro* bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. **Theriogenology**, New York, NY, v.57, n.8, p.2105-2117, 2002.

Recebido para publicar: 12/06/2002

Aprovado: 20/09/2002