

**LÍQUIDO FOLICULAR FRESCO OU CONGELADO NA PRODUÇÃO
IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS**
(*Fresh or frozen follicular fluid in vitro bovine embryo production*)

RAUBER, L.P.^{1,2}; ALVES, D.F.^{1,2}; MOZZAQUATRO, F.D.^{1,2}; TESSMANN, J.V.^{1,2};
BERNARDI, M.L.³; SCHLESTEIN, A.¹; SILVA, C.A.M.¹; RUBIN, M.I.B.¹

¹Embryolab -Departamento de Clínica de Grandes Animais, CCR, UFSM
97.105-900 Santa Maria, RS;

²Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, UFSM, Santa Maria, RS;

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

RESUMO – A manutenção dos complexos cumulus-oócitos (CCO) em líquido folicular (LF) antes da sua maturação, além de visar a capacitação, viabiliza o transporte até o laboratório por ser de baixo custo, de fácil aquisição e o congelamento do LF permite seu armazenamento para futura utilização. Neste experimento avaliou-se o efeito do congelamento do LF obtido de folículos de 2-8mm e de folículos >8mm, sobre a taxa de produção embrionária. Oócitos foram aspirados de folículos de 2 a 8mm de ovários provenientes de abatedouro. No grupo controle (n=295) os CCO foram madurados por 24h. Nos tratamentos GF (n=297) e GC (n=282), os CCO foram mantidos por 6h a 30°C em LF fresco ou congelado, respectivamente, de folículos >8mm. Já no tratamento PF(n=278) e PC (n=281), os CCO foram mantidos em LF fresco ou congelado, respectivamente, de folículos de 2-8mm. Posteriormente, os CCO dos tratamentos GF, GC, PF e PC foram madurados por 18h. Não houve efeito negativo do congelamento do líquido folicular e nem do tamanho dos folículos sobre as taxas de clivagem e produção embrionária em D7 e D9 ($P>0,05$). No entanto, o congelamento do LF de folículos de 2 a 8mm resultou em redução da taxa de eclosão e do número de células dos blastocistos. A manutenção de oócitos bovinos por 6h a 30°C, antes da maturação, pode ser efetuada em líquido folicular de folículos >8mm, fresco ou congelado.

Palavras chave: capacitação, transporte, fluido folicular, retenção da meiose

ABSTRACT – In addition to the capacitation, the maintenance of cumulus-oocyte complex (COC) in follicular fluid (FF) before maturation, allows the transport to the laboratory, being a practical and less expensive media. The FF can be stored after freezing to future use. Oocytes aspirated from bovine slaughterhouse ovaries, were used to evaluate the effect of maintaining the oocytes in fresh or frozen bovine FF (from 2-8mm and >8mm follicles) on the blastocyst rate. In the control group (n=259) the COC were matured for 24h. On treatments GF (n=297) and GC (n=282) the COC were held for 6h at 30°C in fresh or frozen FF from >8mm follicles, respectively. In treatments PF (n=278) and PC (n=281) the COC were held in fresh or frozen FF from 2-8mm follicles, respectively. Later, the COC from GF, GC, PF and PC were matured for 18h. The freezing process as well as the follicle size had no effect on the cleavage, D7 or D9 blastocyst rates ($P>0,05$). Nevertheless, the frozen FF from 2-8mm follicles resulted in a reduced hatching rate and lower ICM cells. Fresh or frozen follicular fluid of >8mm follicles could be used for a 6h transport of bovine oocytes before maturation for 18h.

Key words: capacitation, transport, follicular fluid, meiotic arrest.

Introdução

Dentro do folículo, o oócito está em repouso na prófase da primeira divisão meiótica. Quando o oócito permanece no folículo, a maturação nuclear somente ocorre com a ocorrência do pico de LH (SIRARD, 1990).

Com base nestes aspectos e no fato de que a quebra da vesícula germinativa (VG) ocorre mais rapidamente *in vitro* (5 a 6h) do que *in vivo* (7 a 10h), tem sido sugerido que antes da maturação seja requerido um período de pré-maturação, que ocorre naturalmente *in vivo* durante o desenvolvimento pré-ovulatório

(HENDRIKSEN *et al.*, 2000). Acredita-se que a manutenção da meiose antes da maturação, faça com que o oócito seja capaz de sintetizar ou modificar proteínas essenciais e transcrever mRNA para o futuro desenvolvimento embrionário (FOULADI NASHTA *et al.*, 1998).

As células da granulosa são competentes para secretar fatores inibitórios, presentes no líquido folicular (LF), os quais mantêm o oócito em vesícula germinativa (RICHARD e SIRARD, 1996). O LF bovino é um exsudato do plasma sanguíneo com diferentes fatores protéicos, glicoproteínas, glicosaminoglicanos, esteróides e muitos outros metabólitos sintetizados pelas células da parede folicular (GORDON, 1994). Embora o LF iniba a retomada da meiose, esta atividade inibitória decresce com o aumento do diâmetro folicular e o início da atresia do folículo (AYOUB *et al.*, 1993; BLONDIN *et al.*, 1997; SIRARD *et al.*, 1999).

No presente trabalho, avaliou-se o efeito do congelamento do LF, obtido de folículos de diferentes diâmetros na manutenção de oócitos bovinos, antes da maturação, sobre a produção *in vitro* de embriões.

Material e Métodos

Para avaliar o efeito do tamanho dos folículos e do congelamento do LF sobre a produção *in vitro* de embriões, foram constituídos cinco grupos. No grupo controle (GC) os oócitos não foram expostos ao LF antes da maturação. Em dois dos outros grupos, os oócitos foram expostos por 6h a 30°C ao LF fresco de folículos >8,0mm (GF) ou de 2 a 8mm (PF). O LF congelado de folículos >8,0mm (GC) ou de 2 a 8mm (PC) foi utilizado para manter os oócitos dos dois grupos restantes.

O LF de folículos de 2 a 8mm de diâmetro, foi aquele resultante da punção dos ovários para a obtenção de oócitos. Para a obtenção do LF de folículos maiores de 8,0 mm punctionou-se todos os folículos, que na superfície do ovário, apresentavam mais de 8,0 mm de diâmetro. Para a punção dos folículos e aspiração do LF e/ou dos oócitos utilizou-se uma bomba de vácuo (Nevoni Equipamento Odonto Méd. Hospitalar Ltda).

O LF foi centrifugado por 10 minutos a 1000g sem ser filtrado. Para aquele que foi congelado,

o sobrenadante foi distribuído em alíquotas de 500µL em tubos Eppendorf (Eppendorf AG 22331, Hamburg, Alemanha), de fundo cônico, e estocado a -20°C por três a seis meses.

Ovários provenientes de vacas abatidas foram transportados a 30°C em solução fisiológica a 0,9% de NaCl. No laboratório, foram lavados em álcool 70° e, em seguida, lavados em solução fisiológica. Os oócitos aspirados foram mantidos em LF para identificação e seleção sob lupa estereomicroscópica sendo selecionados de acordo com o aspecto morfológico dos Complexos Cumulus-oócitos (CCO), conforme os critérios descritos por DE LOOS *et al.* (1989).

Efetuada a seleção, os CCO foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 25. Os oócitos do grupo Controle (n=295) foram lavados cinco vezes em meio TCM-199 (Sigma Chemical CO - USA) adicionado de 5,95mg/ml de HEPES (Sigma Chemical CO.), 0,025mg/mL de piruvato de sódio e 10% de soro de égua em estro (SEE). Este grupo foi colocado diretamente no meio de maturação, constituído do meio TCM-199 acrescido de 0,01UI de rFSHh/mL (Serono; L1930300), em gotas de 400µL, em placas de cultivo de quatro poços (Nunc A/S; Cat.176740), permanecendo por 24h em estufa de cultivo (Heraeus; Alemanha) a 39°C, com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada.

Os oócitos dos grupos GF (n=297), GC (n=282), PF (n=278) e PC (n=281) foram depositados em 400µL de LF correspondente, acrescido de 30µg/ml de heparina, em tubos de poliestireno (Fisher Scientific Company, Pittsburgh, USA) de 5mL. Os tubos foram vedados, envoltos por papel alumínio e mantidos em banho-maria por 6h a 30°C, sem controle da atmosfera gasosa. Após esse período, os oócitos recuperados foram lavados com meio TCM-HEPES e maturados por 18h em meio idêntico ao utilizado na maturação do grupo controle.

Os oócitos maturados foram transferidos para gotas de 400µL de meio TALP-FERT, com 6mg/ml de BSA (Gibco BRL), 0,11mg/ml de piruvato de sódio, PHE e 30µg/ml de heparina. Utilizou-se sêmen congelado de *Bos taurus* cujos espermatozóides foram selecionados por migração ascendente (*swim-up*), em meio

TALP-SPERM. Para a fecundação utilizou-se a concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL. A incubação dos oócitos/espermatozoides foi conduzida nas mesmas condições da maturação, por um período de 18h.

Após o período de fecundação, os oócitos/zigotos foram submetidos à agitação mecânica em vórtex para a retirada das células do *Cumulus oophorus*. Os prováveis zigotos foram cultivados em gotas de 400 μ L de SOFaaci, com 5% de SEE, onde permaneceram por 8 dias, em placas de cultivo de quatro poços sob óleo mineral, dentro de bolsas gaseificadas com 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂, em estufa de cultivo a 39°C.

A taxa de clivagem foi avaliada no dia 2 (D2), a de blastocistos (blastocistos iniciais, blastocistos, blastocistos expandidos e eclodidos), no dia 7 (D7) e a de blastocistos expandidos e eclodidos, no dia 9 (D9). A taxa de eclosão foi calculada sobre o número de blastocistos obtidos no D7. Considerou-se a data da fecundação como dia zero (D0). Os blastocistos eclodidos foram fixados em paraformolaldeído a 2%, para a contagem do número de células. Os embriões foram corados com Hoechst na concentração final de 10 μ g/mL em PBS salino. A visualização foi efetuada

em microscópio de epifluorescência com filtro de excitação (365nm) e filtro de barreira (410 nm).

Os diferentes tratamentos foram realizados simultaneamente, cada uma das doze repetições sendo considerada um bloco. Os dados referentes ao número de células dos blastocistos foram submetidos à transformação logarítmica de modo a uniformizar a variância. Os resultados foram analisados pelo programa estatístico SAS utilizando o procedimento GLM (SAS, 1998) e as médias comparadas pelo teste de Tukey com um nível de 5% de significância. A taxa de eclosão foi analisada pelo teste χ^2 com nível de 5% de significância.

Resultados

Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos nas taxas de clivagem em D2 e de desenvolvimento embrionário em D7 e D9. O grupo de oócitos mantidos em LF de folículos de 2 a 8 mm e congelado (PC) produziu uma taxa de eclosão, em D9, inferior ($P<0,05$) aos demais tratamentos (TABELA 1). Os blastocistos eclodidos do grupo PC apresentaram um número de células inferior ($P<0,05$) aos do grupo GF (TABELA 2).

TABELA 1 – DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO APÓS A FECUNDAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS MANTIDOS POR 6H A 30°C EM LÍQUIDO FOLICULAR FRESCO OU CONGELADO ANTES DA MATURAÇÃO. SANTA MARIA – RS, 2002.

Origem do líquido folicular	(n)	Oócitos	% Clivagem	% de blastocistos		% de eclosão D7/D9
		D2	D7	D9		
Controle	295	88,5	31,0	23,6	39/92 (42,4) ^a	
>8mm fresco	297	88,9	36,1	26,4	53/107 (49,5) ^a	
>8mm congelado	282	85,4	30,0	20,9	34/85 (40,0) ^a	
2 a 8mm fresco	278	86,8	28,8	19,7	39/81 (48,1) ^a	
2 a 8mm congelado	281	86,6	31,4	18,8	20/88 (22,7) ^b	

^{a,b} Letras diferentes nas colunas diferem significativamente ($P<0,05$)

Discussão

Um período de pré-maturação, considerado necessário para simular o desenvolvimento pré-ovulatório que ocorre *in vivo* (HENDRIKSEN *et al.*, 2000), poderia ser efetuado pela manutenção dos oócitos em líquido folicular. No entanto, o tamanho dos folículos que servem de fonte de LF parece ser importante pois RAUBER *et al.* (2002) constataram que oócitos

mantidos por 6h em LF de folículos de 8,1 a 14mm apresentaram maior taxa de blastocistos em D7, quando comparados ao grupo mantido em LF de folículos de 3 a 5mm. Esta hipótese é reforçada pelas observações de que a presença de LF bovino de folículos >15mm, no meio de maturação (ELMILEIK *et al.*, 1995), e de folículos de 1 a 5mm, no meio de fecundação (CHOI *et al.*, 1998), apresentaram um efeito positivo e negativo, respectivamente, sobre o

desenvolvimento embrionário em bovinos. Além disto, oócitos bovinos obtidos de folículos antrais cultivados por 24h tiveram desenvolvimento significativamente maior do que os aspirados diretamente de folículos de 3 a 8mm de diâmetro (FOULADI NASHTA et al., 1998).

No presente estudo, as taxas de clivagem e desenvolvimento até o estágio de blastocisto em D7 e D9 foram semelhantes, apesar de o LF ser proveniente de folículos de diferentes diâmetros. Mesmo sendo o grupo PC composto

de LF de folículos com grande variação de tamanho (de 2 até 8mm), cuja composição é variável (DODE et al., 2000; RODOVALHO et al., 2000; BEG et al., 2002), é provável que um possível efeito prejudicial da manutenção dos oócitos em LF de folículos pequenos, como o relatado por RAUBER et al. (2002), para folículos de 3 a 5mm, tenha sido amenizado. Isto porque o volume de LF aspirado de folículos menores de 5mm foi, provavelmente, inferior proporcionalmente ao obtido dos folículos entre 5 e 8mm, no presente estudo.

TABELA 2 – NÚMERO MÉDIO DE CÉLULAS DE BLASTOCISTOS ECLODIDOS OBTIDOS APÓS A FECUNDAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS MANTIDOS POR 6H A 30°C LÍQUIDO FOLICULAR FRESCO OU CONGELADO ANTES DA MATURAÇÃO. SANTA MARIA- RS, 2002.

Origem do líquido folicular	Número de embriões	Número de células ± desvio-padrão
Controle	26	121,4 ± 33,4 ^{ab}
>8mm fresco	34	137,3 ± 40,1 ^a
>8mm congelado	19	116,3 ± 42,4 ^{ab}
2 a 8mm fresco	22	115,1 ± 39,3 ^{ab}
2 a 8mm congelado	19	107,2 ± 31,2 ^b

^{a,b} Letras diferentes nas colunas diferem significativamente ($P<0,05$)

O congelamento do líquido folicular facilitaria o armazenamento para o seu uso posterior, simplificando a sua utilização, sobretudo quando o objetivo fosse o de transportar os oócitos obtidos por OPU. No presente estudo, o LF congelado, mesmo quando acrescido de 30 μ g/mL heparina, coagulou em todas as repetições efetuadas. A formação de coágulo exigiu que os oócitos fossem liberados, antes de ir para a maturação, para evitar possível interferência nas trocas de nutrientes e prejuízo na etapa de fecundação. A liberação dos oócitos do coágulo foi realizada manualmente, com o auxílio de capilares de vidro com as extremidades seladas. Observou-se que esta manipulação implica na perda de células do *cumulus oophorus*. Um efeito prejudicial do congelamento do LF foi observado quando o mesmo foi obtido de folículos de 2 a 8mm, visto a menor taxa de eclosão deste grupo, em relação aos demais. Além disto, a associação da manutenção dos oócitos em LF de folículos de 2 a 8mm associado ao congelamento do mesmo, resultou em um menor número de células se comparado ao grupo de oócitos mantido na presença de LF fresco, proveniente

de folículos grandes. Não se sabe se o efeito prejudicial foi devido à coagulação do LF.

Com base nos resultados obtidos, tanto o líquido folicular fresco como o congelado, obtido de folículos >8,0mm, podem ser utilizados para a manutenção dos oócitos antes da maturação. No entanto, para evitar os inconvenientes advindos da coagulação, no caso de seu congelamento, seria importante investigar a causa de modo a evitá-la. ARAKAWA et al. (2001) salientam que várias proteínas podem desnaturar durante o processo de congelamento - descongelamento, comprometendo sua estabilidade ao longo do armazenamento, pela exposição às mudanças químicas e físicas que ocorrem, as quais podem alterar a estrutura protéica, levar à exposição de áreas hidrofóbicas e, como consequência, facilitar a formação de agregados; além de depender da temperatura de armazenamento, a instabilidade das proteínas aumenta com o tempo de armazenamento. Desta forma, é possível que a coagulação observada no presente estudo possa estar relacionada ao tempo de armazenamento do LF, que variou de três a seis meses.

Conclusão

A manutenção de oócitos bovinos por 6h a 30°C, antes da maturação, pode ser efetuada em líquido folicular de folículos >8mm, fresco ou congelado. O congelamento do líquido folicular de folículos de 2 a 8mm prejudica a qualidade dos blastocistos obtidos, expressa por redução na taxa de eclosão e no número de células.

Referências

- ARAKAWA, T.; PRESTRELSKI, S.J.; KENNEY, W.C.; CARPENTER, J.F. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 46, p. 307-326, 2001.
- AYOUB, M.A.; HUNTER, A.G. Inhibitory effect of bovine follicular fluid on *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Journal of Dairy Science**, Savoy, IL, v. 76, n. 1, p. 95-100, 1993.
- BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K.; GINTHER, O.J. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. **Biology of Reproduction**, Madison, WI, v. 66, n. 1, p. 120-26, 2002.
- BLONDIN, P.; COENEN, K.; GUILBAULT, L.A.; SIRARD, M.A. *In vitro* production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology**, New York, NY, v. 47, n. 5, p. 1061-75, 1997.
- 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**, New York, v. 49, n. 6, p. 1103-12, 1998.
- DE LOSS, F.; VAN VLIET, C.; VAN MAURIK, P.; KRUIP, T.A. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**, New York, NY, v. 24, n. 2, p. 197-204, 1989.
- DODE, M.A.N.; RODOVALHO, N.C.M.; ROCCAS, G.E.; UNANIAN, M.M. Composição química do líquido folicular bovino de acordo com tamanho de folículo. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, RS, v. 28, n. 1, p. 243, 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**, Amsterdam, v. 38, n. 1-2, p. 85-96, 1995.
- FOULADI NASHTA, A.A.; WADDINGTON, D.; CAMPBELL, K.H.S. Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development *in vitro*: a comparative evaluation of antral follicle culture with other methods. **Biology of Reproduction**, Madison, WI, v. 59, n.2 , p. 255-62, 1998.
- GORDON, I. **Laboratory Production Of Cattle Embryo**. Cambridge: CAB International, 1994. 640 p.
- HENDRIKSEN, P.J.M.; VOS, P.L.A.M.; STEENWEG, W.N.M.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. **Theriogenology**, New York, NY, v. 53, n. 1, p. 11-20, 2000.
- RAUBER, L.P.; ALVES, D.F.; PINTO, M.G.L.; HILGERT, T.F.; BRUM, D.S.; BERNARDI, M.L.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B. Embryo development of bovine oocytes held in bovine follicular fluid from different size follicles. In: 18th Scientific Meeting A.E.T.E. 2002, Rolduc, **Anais European Embryo Transfert Association**, 2002, p.220.
- RICHARD, F.; SIRARD, M.A. Effects of follicular cells on oocyte maturation II: theca cell inhibition of bovine oocyte maturation *in vitro*. **Biology of Reproduction**, Madison, WI, v. 54, n. 1, p. 22-28, 1996.
- RODOVALHO, N.C.M.; DODE, M.A.N.; MADRUGA, C.R.; UNANIAN, M.M. Proteoma do líquido folicular bovino em função do tamanho folicular. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, RS, v. 28, n. 1, p. 322, 2000.
- SAS INSTITUTE (Cary NC). **SAS user's guide: Statistical Analysis System**, Release 6.12-1998.
- SIRARD, M.A. Temporary inhibition of meiosis resumption *in vitro* by adenylate cyclase stimulation in immature bovine oocytes. **Theriogenology**, New York, NY, v. 33, n. 4, p. 757-67, 1990.
- SIRARD, M.A., PICARD, L., DERY, M., COENEN, K., BLONDIN, P. The time interval between FSH administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes. **Theriogenology**, New York, v. 51, n. 4, p. 699-708, 1999.

Recebido: 25/10/2002

Aprovado: 02/06/2003