

LÍQUIDO FOLICULAR EQÜINO NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS (*Equine follicular fluid on in vitro maturation of bovine oocytes*)

PINTO, M.G.L.¹; RUBIN, M.I.B.²; SILVA, C.A.M.²; HILGERT, T.F.³; SÁ FILHO, M.F.³;
RUBIN, F.B.³; BERNARDI, M.L.⁴

¹Médico Veterinário;

²Embryolab - Laboratório de Embriologia e Reprodução Animal do DCGA, Centro de Ciências Rurais, UFSM.97.105-900 Santa Maria, RS. Autor para correspondência: mararubin@smail.ufsm.br;

³Medicina Veterinária, bolsista de iniciação científica;

⁴Departamento de Zootecnia, UFRGS, 91.540-000 Porto Alegre, RS.

RESUMO – O desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos maturados *in vitro* (MIV) foi avaliado em meio suplementado com líquido folicular eqüino (Lfe). Foram distribuídos 1045 oócitos em 11 repetições formando três grupos tratamentos (T1, T2, T3) e um controle (C). O meio de maturação utilizado foi o TCM-199 acrescido de piruvato de sódio, hormônio folículo estimulante recombinante (rFSHh) e hormônio luteinizante equino (LHe). Suplementou-se esse meio com 10% de soro de égua em estro para o grupo controle e para T1, T2 e T3, o meio foi suplementado com 5, 10, e 20% de LFe, respectivamente. Os oócitos foram maturados *in vitro* (MIV) por 24h. A fecundação *in vitro* (FIV) foi realizada em meio Talp-Fert. A MIV e a FIV foram realizadas em estufa a 39°C com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. Os zigotos foram cultivados em meio SOFaaci, sob óleo mineral no interior de bolsas plásticas gaseificadas. As taxas de clivagem e de blastocistos foram observadas diariamente (D), e em D7, foram superiores (P<0,05) para o T2, em comparação ao T1 e T3, mas semelhantes (P>0,05) às do grupo controle. Em D9, a taxa de blastocistos do T2 foi superior (P<0,05) à do controle e T1, mas semelhante à do T3. Não houve diferença na taxa de eclosão entre os grupos (P>0,05). O LFe, na concentração de 10% pode ser utilizado, em substituição ao soro de égua em estro para suplementar o meio de MIV de oócitos bovinos.

Palavras chaves: oócitos bovinos, fluido folicular eqüino, maturação *in vitro*.

ABSTRACT – Embryo development of bovine oocytes was evaluated using maturation medium supplemented with equine follicular fluid (eFF). One thousand and forty five (1045) oocytes were distributed in 11 replications forming three treatment groups (T1, T2 e T3) and one Control (C). TCM-199 added with sodium pyruvate, rFSHh and LHe was used as maturation medium. This medium was supplemented with 10% estrous mare serum for Control group, and 5, 10, and 20% eFF, respectively, for T1, T2 e T3 groups. *In vitro* maturation (IVM) of all groups was performed during 24h. *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 gasified bags. Cleavage and blastocyst rates were daily observed (D), and at D7, were higher (P<0.05) for T2 than T1 and T3, but they were similar (P>0.05) for those from control group. At D9, blastocyst rate of T2 was higher (P<0.05) for those from control and T1, but similar for T3. No differences were observed on hatching rates between groups (P>0.05). The eFF, at a 10% concentration, can replace the use of estrous mare serum to supplement the IVM medium of bovine oocytes.

Key words: bovine oocytes, equine follicular fluid, *in vitro* maturation.

Introdução

Os meios utilizados para a produção *in vitro* (PIV) de embriões, classificados como definidos, são aqueles livres de soro ou outro material biológico. Já os meios indefinidos

são os que possuem alguma substância de origem biológica na sua composição. Os sistemas de PIV utilizando-se de meios definidos têm sido o alvo de muitos pesquisadores que buscam caracterizar as necessidades específicas para a maturação

do oócito (NAGAI, 2001), atenuar as variações nas taxas de produção nos laboratórios (MARQUANT-LEGUIENNE e HUMBLOT, 1998), além de evitar riscos de infecção dos oócitos por agentes patogênicos (STRINGFELLOW, 1998).

Embriões bovinos têm sido produzidos *in vitro* em sistemas completamente definidos (KESKINTEPE e BRACKETT, 1996; WATSON *et al.*, 2000). Por outro lado, a suplementação protéica é benéfica ao desenvolvimento embrionário *in vitro* (CAROLAN *et al.*, 1995). Embriões produzidos na ausência de proteínas apresentam diferenças na sua atividade metabólica, uma diminuída capacidade de desenvolvimento, menor teor protéico e menor número de células (GOMEZ e DIEZ, 2000). O líquido folicular homólogo tem sido empregado na MIV de oócitos de diversas espécies. Em suínos, VATZIAS e HAGEN (1999) obtiveram melhorias no processo de maturação *in vitro*, redução da polispermia e aumento na taxa de FIV, com o uso do líquido folicular porcino. AGUILAR *et al.* (2001) observaram que oócitos eqüinos podem ser submetidos a MIV em 50 ou 100% de LFe. Diversas pesquisas evidenciam efeitos positivos da adição de líquido folicular homólogo ao meio de maturação de oócitos bovinos. ADONA *et al.* (2000) observaram um estímulo à maturação nuclear, além do maior desenvolvimento embrionário dos oócitos maturados na presença de LF (SIRARD *et al.*, 1995; ELMILEIK *et al.*, 1996; KIM *et al.*, 1996).

FIGUEIRÓ *et al.* (2000) relataram a possibilidade de substituição do soro de vaca em estro por soro de égua em estro (SEE) nos meios de maturação e cultivo para a produção *in vitro* de embriões bovinos. Isso demonstra que a utilização de material heterólogo pode ser uma alternativa na PIV de embriões. Além disso, tal prática pode prevenir a transmissão de doenças espécie-específicas que podem ser carregadas pelos diferentes materiais de origem protéica, que podem ser fontes potenciais de agentes patogênicos (GUERIN *et al.*, 1997; STRINGFELLOW *et al.*, 2000).

Por estas razões, foi avaliado se a

suplementação do meio de maturação de oócitos bovinos com LFe proporciona um desenvolvimento embrionário *in vitro* semelhante àquele obtido com soro de égua em estro, bem como avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de líquido folicular, na maturação, sobre o desenvolvimento embrionário.

Material e Método

Ovários eqüinos obtidos em frigorífico tiveram os folículos com diâmetro inferior a 35mm puncionados, tendo seu líquido folicular aspirado com o auxílio de bomba de vácuo. O líquido folicular obtido foi centrifugado por 10 minutos a 1000g e o sobrenadante depositado em tubos e estocado a -20°C .

Os oócitos foram obtidos de ovários provenientes de vacas abatidas em frigorífico e transportados a 30°C em solução fisiológica acrescida de estreptomomicina e penicilina G-Potássica, em período não superior a duas horas após o término do abate. Os oócitos foram mantidos em líquido folicular para a procura sob lupa estereomicroscópica e selecionados de acordo com o critério descrito por De LOOS *et al.* (1989). Os CCO de qualidade I e II foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de 20 a 30 oócitos constituindo os seguintes tratamentos: TCM + 5% LFe (T1); TCM + 10% LFe (T2); TCM + 20% LFe (T3) e TCM + 10% SEE (soro de égua em estro; grupo-controle).

Os oócitos, após a seleção, foram lavados com TCM-199, adicionado de HEPES e 10% de SEE e, em seguida, transferidos para placas de cultivo de quatro poços contendo gotas de $400\mu\text{L}$ do meio de maturação. As placas foram mantidas por 24 horas em estufa de cultivo, a 39°C , com 5% de CO_2 em ar e umidade saturada. A maturação foi conduzida com o meio TCM-199 adicionado de hormônio folículo estimulante recombinante (rFSHh), hormônio equino (LHe) e piruvato de sódio, com 10% de SEE para o grupo Controle, 5% de LFe para os oócitos do T1, 10% de LF para os oócitos do T2 e 20% de LFe para os oócitos do T3.

Após o período de MIV, os oócitos foram transferidos para gotas de $400\mu\text{L}$ de meio

TALP-FERT. Para a fertilização, utilizou-se sêmen congelado de *Bos taurus*, cujos espermatozoides foram selecionados por migração ascendente (PARRISH et al, 1996) na concentração de 1×10^6 sptz/mL. A incubação dos oócitos com os espermatozoides foi conduzida nas mesmas condições da maturação.

Após a fecundação, os presumíveis zigotos foram liberados das células do *Cumulus oophorus* por meio de agitador mecânico. Em seguida, foram transferidos para o meio SOFaaci (HOLM et al. 1999), enriquecido com 5% de SEE onde permaneceram por oito dias em gotas de 400 µL, em placas de cultivo de quatro poços sob óleo mineral. As placas foram mantidas no interior de bolsas plásticas (PALMA et al., 1998) insufladas 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 CCO foram distribuídos em 4

grupos e 11 repetições. As taxas de clivagem e de blastocistos foram avaliadas no D2, D7 e D9. Em D9 foi avaliada também a taxa de eclosão que foi calculada sobre o número de blastocistos em D9. O dia da fecundação foi considerado como D0.

Os tratamentos foram conduzidos simultaneamente. Os percentuais de clivagem, desenvolvimento e eclosão foram comparados pelo teste Qui-quadrado, com nível de significância de 5%.

Resultados

A presença de 10% de LFE (T2) resultou em taxas de clivagem e de blastocistos, em D7, superiores ($P < 0,05$) às observadas com 5% (T1) e 20% (T3) de LFE, mas semelhantes ($P > 0,05$) às do grupo controle (Tabela 1). Em D9, a taxa de blastocistos do T2 foi superior ($P < 0,05$) à do controle e T1, mas semelhante à do T3. Não houve diferença na taxa de eclosão entre os tratamentos ($P > 0,05$).

TABELA 1 - DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES APÓS A FECUNDAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS MATURADOS *IN VITRO* SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE LÍQUIDO FOLICULAR EQÜINO.

Tratamentos	CCOs		Blastocistos n(%)		Eclosão n(%)
	n	Clivados n(%)	D7 (Bi, Bl, Bx)	D9 (Bx, Bh, Be)	
10% Soro de égua em estro Controle	258	223 (86,4) ^{ab}	75 (29,1) ^{ac}	49 (19,0) ^a	16 (32,7) ^a
5% Líquido folicular eqüino (T1)	265	216 (81,5) ^a	54 (20,4) ^b	43 (16,2) ^a	13 (30,2) ^a
10% Líquido folicular eqüino (T2)	263	235 (89,4) ^b	94 (35,7) ^a	73 (27,8) ^b	27 (37,0) ^a
20% Líquido folicular eqüino (T3)	259	214 (82,6) ^a	68 (26,3) ^{bc}	56 (21,6) ^{ab}	20 (35,7) ^a

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

CCOs= complexos cumulus-oócitos

A taxa de eclosão refere-se ao número de blastocistos eclodidos sobre o número de blastocistos em D9

Discussão

O líquido folicular eqüino exerceu um efeito benéfico sobre a maturação de oócitos bovinos e o seu subsequente desenvolvimento. A suplementação do meio de maturação com 10% de LFe (T2) mostrou-se a mais adequada, já que este tratamento resultou em melhores taxas de desenvolvimento. Entretanto, a concentração de 5% de LFe parece não ter sido suficiente para prover aos oócitos as proteínas e outros fatores necessários a uma MIV adequada. SIRARD *et al.* (1998) citam que alguns fatores são responsáveis pela inibição do reinício da meiose (maturação nuclear) enquanto outros são responsáveis pela maturação citoplasmática. Diversos autores, também, demonstraram os efeitos benéficos da maturação de oócitos em meio suplementado com líquido folicular para o desenvolvimento embrionário *in vitro* (SIRARD *et al.*, 1995; ELMILEIK *et al.*, 1996; KIM *et al.*, 1996; ROMERO-ARREDONDO e SEIDEL, 1996). As concentrações testadas que proporcionaram maior desenvolvimento embrionário variaram entre 10 e 30% do volume total do meio de maturação. ADONA *et al.* (2000) relatam que a adição de 40% de LF estimulou a maturação nuclear, aumentando a taxa de oócitos que atingiram a metáfase II em 24 h de cultivo. Por outro lado, concentrações mais altas, como 60% de LF, prejudicaram o subsequente desenvolvimento embrionário (ELMILEIK *et al.*, 1996; KIM *et al.*, 1996).

O soro sangüíneo e a albumina sérica bovina são os componentes mais utilizados para a suplementação protéica dos meios de cultura de embriões. O soro contém hormônios, fatores de crescimento, vitaminas, quelantes de íons de metais pesados, peptídeos, proteínas e outras moléculas definidas e não definidas (KESKINTEPE e BRACKETT, 1996). O líquido folicular é um transudato sérico modificado pela atividade metabólica folicular que possui constituintes específicos, como esteróides e glicoproteínas sintetizadas

pelas células da parede do folículo (GORDON, 1994). Apesar da semelhança entre o soro e o líquido folicular, parece haver uma relação muito mais estreita entre o líquido folicular e o oócito. Como a maturação do folículo e do seu oócito são eventos paralelos e relacionados funcionalmente, é de se supor que o líquido folicular seja mais adequado como suporte nutricional para o desenvolvimento do oócito. Pouco se sabe, no entanto, dos efeitos do líquido folicular eqüino sobre oócitos bovinos. Embora tenham sido descritos alguns eventos espécie-específicos na égua, os mecanismos fisiológicos da foliculogênese em eqüinos não parecem ser fundamentalmente diferentes dos outros mamíferos (GÉRARD *et al.*, 1999).

O emprego do líquido folicular eqüino proporciona a vantagem, sendo heterólogo, de prevenir a transmissão de doenças espécie-específicas, passíveis de serem carregadas pelos diferentes materiais de origem protéica (STRINGFELLOW *et al.*, 2000). Além disso, devido ao maior diâmetro dos folículos eqüinos, um grande volume de líquido folicular pode ser obtido sem dificuldade.

Conclusões

A suplementação do meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos pode ser efetuada com líquido folicular eqüino, sendo a concentração de 10% a que proporciona melhor desenvolvimento embrionário.

Referências

- ADONA, P.R.; DODE, M.A.N.; RODOVALHO, N.C.M.; FERREIRA, C.B. O uso de líquido folicular para retenção da meiose em ovócitos bovinos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v.28, n.1, p.193, 2000.
- AGUILAR, J.J.; WOODS, G.L.; MIRAGAYA, M.H.; OLSEN, L.M.; VANDERWALL, D.K. Effect of homologous preovulatory follicular fluid on *in vitro* maturation of equine cumulus-oocyte complexes. **Theriogenology**, New York, v.56, n.5, p.745-758, 2001.

- CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; VAN LANGENDONCKT, A.; MERMILLOD, P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Theriogenology**, New York, v.43, n.6, p.1115-1128, 1995.
- DeLOSS, de F.; Van VLIET, C.; Van MAURIK, P.; KRUIP, Th. A.M. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**, New York, v.24, n.2, p.197-204, 1989.
- 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**, Amterdan, v.38, n. p.85-96, 1996.
- FIGUEIRÓ, G.M.; BRUM, D.S.; MEZZALIRA, A.; FIALHO, S.S.; ALVES, M.R.L.; RUBIN, M.I.B.; SILVA, C.A.M. Soro equino 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.
- GÉRARD, N.; DUCHANP, G.; MAGISTRINI M. Relationships between follicular fluid composition and follicular/oocyte quality in the mare. **Livestock Production Science**, London, v. 60, n.2-3, p.243-253, 1999.
- GOMEZ, E.; DIEZ, C. Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.58, n.1-2, p.23-37, 2000.
- GORDON, I. **Laboratory Production Of Cattle Embryo**. CAB International, University Press, Cambridge, 1994. 640p.
- GUERIN, B.; NIBART, M.; MARQUANT-LEGUIENNE, B.; HUMBLOT, P. Sanitary risks related to embryo transfer in domestic animals. **Theriogenology**, New York, v.47, n.1, p.33-42, 1997.
- HOLM, P.; BOOTH, P.J.; SCHMIDT, M.H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. 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, v.52, n.4, p.683-700, 1999.
- KESKINTEPE, L.; BRACKETT, G. *In vitro* developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. **Biology of Reproduction**, Madison, v.55, n.2, p.333-339, 1996.
- 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, v.45, n.4, p.787-799, 1996.
- MARQUANT-LEGUIENNE, B.; HUMBLOT, P. Practical measures to improve *in vitro* blastocyst production in the bovine. **Theriogenology**, New York, v.49, n.1, p.3-11, 1998.
- NAGAI, T. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, New York, v.55, n.6, p.1291-1301, 2001.
- PALMA, G.A.; OLIVIER, N.; ALBERIO, R.H.; BREM, G. *In vitro* development and viability of bovine embryos produced without gassed incubator. **Theriogenology**, New York, v.49, n.1, p.213, 1998.
- PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J., LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; CRISTER, E.S.; EYESTONE, W.H.; FIRST, N.L. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, New York, v.25, n.1, p.591-600, 1996.
- ROMERO-ARREDONDO, A.; SEIDEL Jr., G.E. Effects of follicular fluid during *in vitro* maturation of bovine oocytes on *in vitro* fertilization and early embryonic development. **Biology of Reproduction**, Madison, v.55, n.5, p.1012-1016, 1996.
- 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, v.44, n.1, p.85-94, 1995.
- SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, New York, v.49, n.2, p.483-497, 1998.
- STRINGFELLOW, D.A. Recomendações para o manuseio sanitário de embriões obtidos *In vivo*. In: STRINGFELLOW, D.A., SEIDEL, S. M. eds. MANUAL DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, Savoy, IETS, 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, v.53, n.3, p.827-839, 2000.

VATZIAS, G.; HAGEN, D. R. Effects of porcine follicular fluid and oviduct-conditioned media on maturation and fertilization of porcine oocytes in vitro. **Biology of Reproduction**, Madison, v.60, n.1, p.42-48, 1999.

WATSON, A. J.; De SOUZA, P.; CAVENEY, A.; BARCROFT, L.C.; NATALE, D.; URQUHART, J.; WESTHUSIN, ME. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. **Biology of Reproduction**, Madison, v.62, n. 2, p.355-364, 2000.

Recebido para publicação: 11/11/2003
Aprovado: 18/01/2004