

Avaliação das condições de maturação oocitária e do efeito do reprodutor na produção *in vitro* de embriões bovinos*

Evaluation of oocyte maturation conditions and bull effect on the *in vitro* bovine embryo production

CORRESPONDÊNCIA PARA:
Lia de Alencar Coelho
Departamento de Zootecnia
Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos da USP
Rua Duque de Caxias Norte, 225
- Caixa Postal 23
13630-970 - Pirassununga - SP
e-mail: liac@usp.br

1 - Instituto de Zootecnia de Nova
Odessa - SP
2 - Faculdade de Ciências Agrá-
rias e Veterinárias da UNESP,
Campus de Jaboticabal,
Jaboticabal - SP

Lia de Alencar COELHO¹; Cesar Roberto ESPER²; Joaquim Mansano GARCIA²;
Roberta VANTINI²; Izaltino Rocha SILVA FILHO²; Ivo Luis ALMEIDA Jr.²

RESUMO

Avaliaram-se as condições de cultura para maturação dos oócitos (Exp. I) e o efeito do reprodutor (Exp. II) sobre as taxas de clivagem (TC) e de mórulas e blastocistos (MO/BL) produzidos *in vitro*. Oócitos imaturos foram submetidos a maturação *in vitro* sob diferentes condições: meio B-199, acrescido de 5% de soro de vaca em estro (SVE), 5% de soro fetal bovino (SFB) e células da granulosa (T₁/Exp. I) ou meio B-199, acrescido de 10% de SFB, 14 UI/ml de PMSG e 7 UI/ml de hCG (T₂/Exp. I). Após 24 h de cultura, os oócitos maduros foram inseminados com sêmen descongelado de dois reprodutores (R₁ e R₂/Exp. II) e, após 48 h de incubação, os embriões de 2 e 4 células foram transferidos para placas de cultivo *in vitro*, onde permaneceram em cultura por mais 9 dias. No Exp. I, os oócitos de T₁ e T₂ foram inseminados com sêmen do R₁/Exp. II. No Exp. II, os oócitos do T₁/Exp. I foram inseminados com sêmen de R₁ e R₂/Exp. II. No Exp. I, a TC foi superior (p<0,01) para T₂, quando comparado com T₁. A produção de MO/BL não foi diferente (p>0,05) entre tratamentos. No Exp. II, a TC e a taxa de MO/BL diferiram (p<0,05) para cada reprodutor. A adição de hormônios no meio de maturação, embora não tenha interferido na produção de embriões, parece ser um procedimento mais prático que o uso de células da granulosa. A utilização de sêmen de diferentes reprodutores afetou o subsequente desenvolvimento embrionário *in vitro*.

UNITERMOS: Maturação; Fertilização; *In vitro*; Oócitos; Bovinos.

INTRODUÇÃO

A produção de embriões *in vitro* (PIV) é uma técnica que vem se estabelecendo, sendo largamente utilizada para estudos da fisiologia da maturação e fecundação dos oócitos, capacitação espermática, cultivo de embriões, clonagem, transferência de genes, microinjeção, sexagem, congelação/descongelação de oócitos e embriões. O aprimoramento das técnicas de maturação *in vitro*, desenvolvimento embrionário em sistemas de co-cultura^{7,14} e a aspiração de oócitos de vacas por via transvaginal com auxílio do ultra-som¹¹ vislumbram a aplicação comercial dessa técnica em programas de transferência de embriões na espécie bovina. Entretanto, existe uma grande variação com relação à taxa de clivagem e produção de mórulas e blastocistos oriundos do sistema PIV^{3,9}. Essas diferenças são determinadas por vários fatores decorrentes das etapas que constituem esse sistema, entre eles as condições de cultura para maturação dos oócitos e a variação individual entre reprodutores.

Apesar do estabelecimento de gestações¹³, e obtenção de bezerros¹², a partir do sistema PIV, as taxas de clivagem e de mórulas e blastocistos ainda são baixas, havendo necessidade de maximização da quantidade e da qualidade dos embriões produzidos por esse sistema.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar algumas variáveis que interferem no sistema PIV, como as condições de cultura para maturação dos oócitos (Experimento I) e o efeito do reprodutor (Experimento II) sobre a taxa de clivagem (TC) e a produção de mórulas e blastocistos (MO/BL).

MATERIAL E MÉTODO

Os ovários de vacas provenientes de abatedouro foram transportados para o laboratório à temperatura ambiente e dentro de frascos contendo solução tampão-salina-fosfato (PBS), acrescida de sulfato de gentamicina (50 µg/ml). No laboratório, os ovários foram lavados (2X) com solução PBS e mantidos em banho-maria, a 34-35°C. Os oócitos imaturos, aspirados de folículos de 3-8 mm, foram colocados em placas de Petri (100 mm), contendo meio TCM 199, suplementado com Hepes (25 mM), sulfato de kanamicina (75 µg/ml) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (meio H-199). Sob estereó microscópio (aumento de 10 a 60X), complexos cumulus-oócitos (COCs) foram visualizados, lavados duas vezes em meio H-199 e colocados em cultura por 24h, a 38,5°C em atmosfera com 5% de CO₂, em meio de maturação.

* Projeto financiado pela FAPESP.

O meio básico de maturação foi constituído de meio TCM 199, suplementado com aditivos (1 µg/ml de vitamina B₁₂, 10 µg/ml de insulina, 500 µg/ml de álcool polivinil, 75 µg/ml de ácido ascórbico, 5 µg/ml de inositol, 100 µg/ml de acetato de sódio e glicosamina), Hepes (16,79 mM), bicarbonato de sódio (28,57 mM), piruvato de sódio (2,73 mM) e sulfato de kanamicina (75 µg/ml) (meio B-199).

Para obtenção das células da granulosa, um folículo grande (8 - 10 mm) foi dissecado, perfurado, invertido e, após sucessivas lavagens em meio H-199, procedia-se à raspagem das células em 3 ml de meio B-199. A placa de maturação continha 1 ml de suspensão de células da granulosa e 2 ml de meio B-199.

A fração móvel do sêmen descongelado foi separada por gradiente descontínuo de Percoll. O gradiente foi constituído por soluções a 55% e a 90% de Percoll** a 100%. Para formar o gradiente, no fundo de um tubo de centrífuga contendo previamente a solução de Percoll a 55%, adicionou-se a solução de Percoll a 90% e, sobre as duas soluções, a amostra do sêmen (1 palheta de 0,50 ml) foi depositada delicadamente. Todo o conjunto foi centrifugado a 200 g durante 25 minutos. Após duplas lavagens meio TALP sem cálcio e glicose, suplementado com cafeína e adicionado de sulfato de gentamicina (TALP-SPERM)¹, para retirada do Percoll (130 g/10 minutos), o sedimento foi ressuspenso em meio TALP-SPERM contendo heparina a 100 µg/ml e incubado a 38,5°C em atmosfera com 5% de CO₂. Após 15 minutos, a suspensão de sêmen foi diluída em meio TALP contendo cálcio, glicose, hipotaurina e epinefrina (TALP-FIV)¹, de modo que a concentração espermática fosse ajustada para 10 x 10⁶ espermatozoides/ml e a concentração de heparina para 10 µg/ml. A inseminação foi

realizada em placas com microgotas de 100 µl de suspensão de sêmen, contendo aproximadamente 25 oócitos por gota, e cobertas com óleo de silicone. Após 48h de incubação a 38,5°C em atmosfera com 5% de CO₂, os embriões de 2 e 4 células foram lavados e transferidos para placas, contendo microgotas compostas por 90 µl de meio B-199 e 2 µl de suspensão de células epiteliais do oviduto bovino (BOEC), as quais permaneceram em cultura por 9 dias.

No experimento I, avaliou-se o efeito das condições de maturação sobre a taxa de clivagem (TC) e a produção de mórulas e blastocistos (MO/BL). O meio de maturação (B-199) foi acrescido de 5% de soro de vaca em estro (SVE), 5% de soro fetal bovino (SFB) e células da granulosa (T₁) ou acrescido de 10% de SFB, 14 UI/ml de PMSG e 7 UI/ml de hCG (T₂). Para inseminação dos oócitos, foi utilizado sêmen do Reprodutor 1 (R₁) do Experimento II.

No Experimento II, avaliou-se o efeito do reprodutor sobre a TC e a produção de MO/BL a partir de oócitos maturados de acordo com o T₁ do Experimento I. Para este experimento, foram utilizados dois reprodutores (R₁ e R₂).

A taxa de clivagem (TC) e a produção de MO/BL, para ambos os experimentos, foram avaliadas pelo teste do Qui-quadrado (c²).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento I, a TC foi significativamente superior (p<0,01) para T₂ (hormônios), quando comparado com o T₁ (células da granulosa). Com relação à produção de MO/BL, não houve diferença entre os tratamentos (Tab. 1). Esses resultados não estão de acordo com os obtidos por Fukui; Ono⁵, que encontraram efeito significativo da adição de células da granulosa ao meio de maturação sobre a produção de blastocistos. Esses autores utilizaram altas concentrações de células da granulosa (5 x 10⁶/ml), enquanto neste experimento essa concentração não foi determinada. Isso provavelmente pode ter sido uma das razões pela qual esse tratamento não melhorou a taxa de clivagem. A adição de células da granulosa parece favorecer a aquisição de competência de desenvolvimento embrionário; entretanto, a concentração de células não deve ser inferior a 1 x 10⁶/ml². De acordo com Ireland; Roche⁸, folículos saudáveis e ativos (com secreção de estrógenos) apresentaram grande quantidade de células da granulosa (8,5-8,6 x 10⁶/ml) em relação a folículos inativos (sem secreção de estrógenos) (3 x 10⁶/ml). Isso ressalta a importância de selecionar folículos ativos para a retirada de células da granulosa. Como a competência de desenvolvimento embrionário é traduzida pela habilidade do oócito maturado e fecundado *in vitro* se desenvolver até os estádios de mórula ou blastocisto, e não somente pela taxa de clivagem, a utilização de qualquer um dos tratamentos pode ser recomendada, porém a adição de hormônios apresenta vantagens. Além de ser uma técnica simples e prática, não apresenta o inconveniente da adição de células da granulosa, cujo procedimento é trabalhoso e propenso a contaminação bacteriana e/ou fúngica, fato indesejável no sistema PIV. Provavelmente o tratamento hormonal tenha influenciado a capacidade fecundante dos oócitos, não tendo sido, entretanto, capaz de melhorar a competência de desenvolvimento embrionário.

A utilização de hormônios para maturação de oócitos *in vitro* tem provocado alguns resultados contraditórios. Enquanto alguns traba-

Tabela 1

Taxas de clivagem e de mórulas/blastocistos (MO/BL), a partir da fecundação de oócitos bovinos *in vitro*, submetidos a diferentes condições de maturação *in vitro*¹. UNESP, Jaboticabal-1996.

Tratamentos	Nº de oócitos	Taxa de Clivagem (Nº)**	Taxa de MO/BL (Nº) ^{NS}
T ₁	182	54,0% (99)	12,0% (22)
T ₂	416	84,0% (349)	9,0% (36)

** (p<0,01) = diferiram significativamente ao nível de 1%; NS (p>0,05) = não diferiram significativamente; T₁ = meio B-199 + 5% de soro de vaca em estro (SVE) + 5% de soro fetal bovino (SFB) + células da granulosa; T₂ = meio B-199 + 10% de + SFB + 14 UI/ml de PMSG + 7 UI/ml de hCG; ¹ Experimento realizado no DRA da FCAVJ-UNESP - Jaboticabal-SP durante o período de outubro de 1995 a março de 1996.

Tabela 2

Taxas de clivagem (TC) e de mórulas/blastocistos (MO/BL), a partir de oócitos bovinos maturados *in vitro* e fecundados *in vitro* com sêmen de diferentes reprodutores (R₁ e R₂)¹. UNESP, Jaboticabal-1996.

Tratamentos	Nº de oócitos	Taxa de Clivagem (Nº)*	Taxa de MO/BL (Nº)*
R ₁	182	54,0% (99)	12,0% (22)
R ₂	199	66,0% (132)	9,0% (18)

* (p<0,05) = diferiram significativamente ao nível de 5%; ¹ Experimento realizado no DRA da FCAVJ-UNESP - Jaboticabal-SP durante o período de outubro de 1995 a março de 1996.

** Pharmacia, Uppsala, Suécia.

lhos têm demonstrado que a adição de gonadotrofinas e estradiol ao meio de maturação melhora tanto a capacidade fecundante como a competência de desenvolvimento dos oócitos bovinos¹⁵, outros demonstraram que a suplementação hormonal não surtiu efeito positivo⁵. Provavelmente as doses hormonais e as condições de cultura (tipo de soro, temperatura) sejam os fatores que mais contribuíram para essas contradições.

No experimento II, a TC e a produção de MO/BL diferiram ($p < 0,01$) para cada reprodutor (Tab. 2). Diversas evidências têm mostrado a importância do reprodutor no sistema de produção *in vitro* de embriões^{4,12}. As diferenças existentes entre touros são manifestadas, tanto na capacidade fecundante como na competência de desenvolvimento, mesmo quando algumas variáveis (concentração espermática e de heparina) são padronizadas. Em um mesmo touro, as concentrações espermática e de heparina determinam diferenças na taxa de fertilização e na produção de embriões^{4,6,10}. Portanto, para cada

reprodutor utilizado no sistema PIV, alguns ensaios devem ser previamente desenvolvidos para ajustar a concentração espermática e a dosagem de heparina com a finalidade de maximizar ambos, capacidade fecundante e competência de desenvolvimento embrionário.

CONCLUSÕES

Baseado nos resultados deste trabalho, pode-se concluir que:

- a) a adição de hormônios ao meio de maturação parece não interferir de maneira decisiva na produção de embriões, entretanto mostrou ser um procedimento mais prático em comparação às células da granulosa;
- b) a utilização de sêmen de dois reprodutores resultou em diferentes taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro*, ressaltando a importância da seleção de touros para utilização em sistema de produção de embriões *in vitro*.

SUMMARY

The conditions of *in vitro* maturation of bovine oocytes (Exp. I) and bull effect (Exp. II) on cleavage (CR) and the *in vitro* morulae and blastocysts (MO/BL) rates were evaluated. Imatured oocytes were matured *in vitro* under different conditions: B-199 medium with 5% estrous cow serum (ECS), 5% fetal calf serum (FCS) and granulosa cells (T₁/Exp. I) or B-199 medium with 10% FCS, 14 IU/ml PMSG and 7 IU/ml hCG (T₂/Exp. I). After 24 h culture, the mature oocytes were inseminated with frozen-thawed semen from two bulls (R₁ and R₂/Exp. II). In the Exp. I, the T₁ and T₂ oocytes were inseminated with semen from R₁/Exp. II and in the Exp. II the semen from both bulls inseminated T₁/Exp. I oocytes. After 48 h, the 2-4 cells embryos were transferred into embryo culture droplets and were further cultured for 9 days. The CR of T₂/Exp. I was higher ($p < 0.01$) than T₁/Exp. I. There was a significant difference ($p < 0.05$) between bulls on CR and Mo/Bl production. The use of hormones in a maturation medium has no effect on embryo production, however the procedure seems to be simpler than with granulosa cells. The use of semen from different bulls for *in vitro* fertilization has affected the subsequent *in vitro* production of embryos.

UNITERMS: Maturation; Fertilization; *In vitro*; Oocytes; Bovine.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- COELHO, L.A. **Avaliação da motilidade progressiva e da integridade da membrana plasmática de espermatozoides de bovinos para fecundação *in vitro***. Jaboticabal, 1993. 96p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.
- 2- CRISTER, E.S.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; EYESTONE, W.H. *et al.* Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. **Theriogenology**, v.25, p.150, 1986. (Abstract)
- 3- 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 supplement with the fluid from large bovine follicles. **Animal Reproduction Science**, v.38, n.1/2, p.85-96, 1995.
- 4- EYESTONE, W.H.; FIRST, N.L. Variation in bovine embryo development *in vitro* due to bulls. **Theriogenology**, v.31, p.191, 1989. (Abstract)
- 5- FUKUI, Y.; ONO, H. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. **Journal Reproduction Fertility**, v.86, n.2, p.501-6, 1989.
- 6- GARCIA, J.M.; ESPER, C.R.; OLIVEIRA FILHO, E.B.; CATT, J.W. Efeitos da dosagem de heparina e concentração espermática na fertilização *in vitro* de oócitos bovinos (*Bos indicus*) maturados *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9., Belo Horizonte, 1991. **Anais**. Belo Horizonte : CBRA, 1991. p.293.
- 7- GOTO, K.; KAJIHARA, Y.; KOSAKA, S.; KOBA, M.; NAKANISHI, Y.; OGAWA K. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. **Journal Reproduction Fertility**, v.83, n.2, p.753-8, 1988.
- 8- IRELAND, J.J.; ROCHE, J.F. Growth and differentiation of large antral follicles after spontaneous luteolysis in heifers: changes in concentration of hormones in follicular fluid and specific binding of gonadotropins to follicles. **Journal Animal Science**, v.57, n.1, p.157-67, 1983.
- 9- LOONEY, C.R.; LINDSEY, B.R.; GONSETH, C.L.; JOHNSON, D.L. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. **Theriogenology**, v.41, n.1, p.67-72, 1994.
- 10- SAEKI, K.; NAGAO, Y.; HOSHI, M.; NAGAI, M. Effects of heparin, sperm concentration and bull variation on *in vitro* fertilization of bovine oocytes in a protein-free medium. **Theriogenology**, v.43, n.4, p.751-9, 1995.
- 11- STROUD, B.K.; MYERS, M.W. Clinical results in a commercial IVF facility. **Ars Veterinária**, v.9, p.105-230, 1993. Supplement.
- 12- WATANABE, Y.F.; OLIVEIRA FILHO, E.B. Efeito de touros na produção *in vitro* de embriões bovinos. **Zootecnia**, v.32, p.35, 1994. Supplement.
- 13- WATANABE, Y.F.; OLIVEIRA FILHO, E.B.; QUETGLAS, M.D.; GARCIA, J.M.; NOGUEIRA, M.F.G.; SILVA FILHO, I.R.; VANTINI, R. Desenvolvimento de gestação em bovinos com embriões produzidos em programa de fecundação *in vitro* (FIV). **Ars Veterinária**, v.9, n.2, p.191, 1993. Suplemento.
- 14- XU, K.P.; POLLARD, J.W.; RORIE, R.W.; PLANTEL, L.; KING, W.A.; BETTERIDGE, K.J. Pregnancy rates following transfer of bovine embryos produced by *in vitro* maturation, fertilization and co-culture. **Theriogenology**, v.33, n.1, p.351, 1990. (Abstract)
- 15- YANG, X.; JIANG, S.; FOOTE, R.H. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. **Molecular Reproduction Development**, v.34, p.94-100, 1993.

Recebido para publicação: 30/08/1996

Aprovado para publicação: 23/09/1997