

# EFEITO DO FLUIDO FOLICULAR COMO MEIO INIBIDOR DA MEIOSE DE OÓCITOS BOVINOS *IN VITRO*

ADEMIR M. FERREIRA<sup>1,4</sup>; LETÍCIA B. COSTA<sup>2</sup>; LUIZ S.A. CAMARGO<sup>1</sup>; WANDERLEI F. SÁ<sup>1</sup>; JOÃO H.M. VIANA<sup>3</sup>, JOSÉ VALENTE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610, Juiz de Fora – MG Cep 36038-330

<sup>2</sup> Estudante de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

<sup>3</sup> Estudante de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais

<sup>4</sup> [ademirmf@cnpgl.embrapa.br](mailto:ademirmf@cnpgl.embrapa.br)

**RESUMO:** Para testar o fluido folicular bovino (Ffb) como meio inibidor da meiose, 488 oócitos foram distribuídos aleatoriamente, e mantidos em Talp-hepes (T1) ou 100% Ffb (T2), por 3 e 6 h em banho-maria à 37°C. A progressão da maturação nuclear foi avaliada através de análise cromossômica dos oócitos fixados em lâminas após a aspiração ou após três e seis horas de exposição. Observou-se para T2 maior ( $P<0,05$ ) taxa de oócitos em estágio de quebra da vesícula germinal (VGBD) e uma menor ( $p<0,05$ ) taxa de oócitos em condensação cromossômica I (CCI), concluindo-se que o Ffb foi efetivo na inibição da maturação nuclear.

**PALAVRAS-CHAVE:** fertilização *in vitro*, meiose, vesícula germinal

## EFFECT OF FOLLICULAR FLUID ON INHIBITION OF MEIOSIS OF BOVINE OOCYTES *IN VITRO*

**ABSTRACT:** To test the bovine follicular fluid (Bff) as an inhibitor medium of meiosis, oocytes ( $n=488$ ) were randomly distributed, and kept in Talp-Hepes (T1) or 100% Bff (T2), for 3 and 6 h in water-bath at 37°C. Oocyte nuclear maturation progress was evaluated by chromosomic analysis after aspiration or after three and six hours of treatment. Higher ( $P<0.05$ ) rate of oocytes in germinal vesicle breakdown stage was observed in T2, and a lower ( $P<0.05$ ) rate of oocytes in chromosomic condensation I in T1, concluding that the Bff was effective in the inhibition of oocyte nuclear maturation.

**KEYWORDS:** germinal vesicle, *in vitro* fertilization, meiosis

## INTRODUÇÃO

Com o aumento no uso das técnicas de colheita de oócitos *in vivo* há a necessidade de se desenvolver meios que mantenham o oócito viável durante seu transporte até o laboratório, quando a distância entre esse e o local da coleta for grande. Ao ser removido do ambiente folicular, o oócito espontaneamente retoma a maturação nuclear e reinicia a meiose (HYTTEL et al., 1997; DRIANCOURT e THUEL, 1998). É importante que os oócitos aspirados dos folículos mantenham-se com a meiose inibida, de maneira que haja melhor aproveitamento dos ovócitos provenientes de folículos menores, que constituem a maior parte da população folicular (LONERGAN et al., 1997). Tem sido demonstrado que o fluido folicular possui ação inibidora da maturação de oócitos coletados de ovários de diferentes espécies (SIRARD, 1990; AYOUB e HUNTER, 1993; DOSTAL e PAVLOK, 1996).

Diversos fatores apresentam ação inibidora da meiose de oócitos (SIRARD e BILODEAU, 1990; DRIANCOURT e THUEL, 1998). Entretanto, muitos destes produtos não são compatíveis com a sobrevivência do oócito e, por isso, não podem ser utilizados para melhorar a capacidade de desenvolvimento no cultivo. Por esse motivo têm-se tentado estabelecer métodos fisiológicos para a inibição da retomada da meiose, incluindo a adição de fluido folicular ao meio de cultivo e o cultivo de oócitos em monocamada de células da Granulosa ou da Teca, dentro de hemi-seções foliculares ou ligados à pequena parte da parede folicular (SIRARD e BILODEAU, 1990). O objetivo deste trabalho foi o de avaliar o efeito do fluido folicular bovino como meio inibidor da meiose em oócitos bovinos imaturos e recém-aspirados.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ovários de vacas abatidas no Matadouro Municipal de Juiz de Fora, coletados dentro de um período de 10 a 15 min após o abate de cada animal, e transportados ao laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite em garrafa térmica contendo solução salina fisiológica à temperatura de 32 a 35°C. No laboratório, os ovários foram lavados com a mesma solução e colocados em banho-maria à 37°C. O fluido folicular bovino foi aspirado de folículos de 2 a 6 mm de diâmetro, e o pool de fluido obtido foi centrifugado a 100 G por 10 minutos para remoção das células, adicionado penicilina e estreptomicina, alíquotado e congelado, sendo apenas descongelado na ocasião do uso, conforme procedimento adotado por DÓSTAL e PAVLOK (1996) e por TAKAGI et al. (1998). Oócitos com *cumulus* compacto contendo no mínimo três camadas de células e sem alterações microscópicas visíveis foram recuperados após a sedimentação do fluido folicular aspirado de folículos de 2 a 8 mm, selecionados e mantidos a 37°C em Talp-Hepes até sua distribuição nos meios de cultivo T1) Talp-Hepes (para acompanhamento da maturação espontânea) ou T2) Fluido folicular adicionado com penicilina/estreptomicina.

A progressão da maturação nuclear foi avaliada através de análise cromossômica dos oócitos fixados em lâminas após 3 e 6 h de exposição aos meios de cultivo, de acordo com a seguinte classificação: vesícula germinal (VG; filamentos finos de cromatina formando o padrão arredondado do núcleo, e nucléolo proeminente); quebra da vesícula germinal (VGBD; finos filamentos de cromatina e ausência do padrão nuclear arredondado); Condensação cromossômica I (CCI; finos filamentos cromossômicos podendo as vezes ser distinguidos individualmente) e Condensação cromossômica II (CCII; filamentos cromossômicos contraídos não podendo ser distinguidos individualmente). As lâminas para avaliação das figuras cromossômicas foram confeccionadas por desnudamento mecânico, hipotonização em solução de KCl (0,045 molar) e solução de metanol + ácido acético 2:1, e coloração com aceto-orceína, e avaliadas com auxílio de um microscópio óptico nos aumentos de 40 e 100x. Outros 146 oócitos foram fixados imediatamente após aspiração para avaliação da configuração cromossômica, correspondendo ao tempo zero hora.

Foram realizados os testes de WILCOXON, para analisar o efeito dos meios de cultivo (controle x fluido folicular bovino) em relação aos valores médios obtidos para cada classificação cromossômica, independente do período de exposição, e o teste de KRUSKAL-WALLIS (correlações múltiplas), para avaliar as diferenças para cada variável em função do tempo de exposição aos meios (EUCLYDES, 1997).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os oócitos cujas lâminas foram confeccionadas logo após a aspiração (zero hora), esperava-se uma taxa bem elevada de VG, o que caracterizava a meiose retida, porém observou-se 33,4% de VG e 47,5% de VGBD, conforme Quadro 1. Esta menor taxa de VG encontrada, em relação à esperada, indica que grande parte dos oócitos retomaram o processo de meiose, o que pode ser consequência do período decorrido na manipulação dos oócitos desde a aspiração até a fixação da lâmina, como sugeriram SÜSS & WÜTHRICH (1985). Ainda em relação ao Quadro 1, observa-se que não houve diferença entre os resultados obtidos em 3 e 6 h para T2, indicando que o efeito inibitório foi independente do tempo de exposição ao meio em questão.

Avaliando os resultados dos meios de cultivo, independente do período de exposição, observou-se em T2 um aumento ( $P<0,05$ ) do número de oócitos em estágio de quebra da vesícula germinal (VGBD) e ainda, uma tendência à diminuição do número de oócitos em condensação cromossômica I e II, quando comparados aos resultados obtidos com o T1 (Quadro 2).

Observou-se efeito inibitório do fluido folicular sobre a progressão da meiose de oócitos bovinos, de maneira coerente com os resultados obtidos por AYOUB e HUNTER (1993) e DÓSTAL e PAVLOK (1996). Os fatores responsáveis por esta inibição não estão completamente identificados, mas sabe-se que agem através das células do *cumulus*, uma vez que o cultivo de oócitos desnudos com substâncias

conhecidamente inibidoras não impediu a retomada da meiose destes oócitos (DRIANCOURT e THUEL, 1998). A observação de que várias substâncias contidas no fluido folicular (ácido linoléico e purinas, como a hipoxantina e adenosina) promovem a manutenção dos oócitos em estágio de dictióteno sugere que este efeito inibidor não se deve apenas a um, mas sim a um conjunto de fatores inibidores e que a inibição da maturação nuclear de oócitos deve-se ao envolvimento de diversos fatores inibidores atuando por diversos mecanismos distintos.

Por outro lado, SIRARD e FIRST (1988) não observaram efeito inibitório do fluido folicular sobre oócitos, quando utilizaram esse meio em menores proporções (50%), sugerindo um efeito dose-dependente. BEVERS et al. (1997) também observaram um menor efeito inibitório de folículos maiores, sugerindo que as alterações ocorridas na composição do fluido folicular com o decorrer do desenvolvimento do folículo, levam à uma diminuição deste efeito inibitório e o surgimento de um estímulo à maturação.

Por ser o fluido folicular um meio fisiológico, e que apresenta esta atividade inibitória *in vitro*, torna-se uma alternativa simples e eficaz o

#### CONCLUSÕES

O fluido folicular bovino de folículos de 2 a 6 mm de diâmetro demonstrou ter efeito inibitório sobre a retomada da maturação nuclear de oócitos bovinos após até 6 h de exposição, sendo um meio alternativo para o transporte de oócitos.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. AYOUB, M. A., HUNTER, A. G. Inhibitory effect of bovine follicular fluid on in vitro maturation of bovine oocytes. *J. Dairy Sci.*, v.76, p. 95-100, 1993.
02. BEVERS, M. M., DIELEMAN, S.J., VAN DEN HURK, R., IZADYAR, F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology*, v. 47, p. 13 - 22, 1997.
03. DOSTÁL, J., PAVLOK, A. Isolation and Characterization of maturation inhibiting compound in bovine follicular fluid. *Reprod. Nutr. Develop.*, v.36, p. 681-690, 1996.
04. DRIANCOURT, M.C., THUEL, B. Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. A review. *Reprod. Nutr. Develop.*, v.38, p. 345-362, 1998.
05. EUCLYDES, *Manual de utilização do Saeg (Sistema de análises estatísticas)*. UFV/Imprensa Universitária; 1997.
06. HYTTEL, P., FAIR, T., CALLESEN, H., GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, v.47, p. 23-32, 1997.
07. LONERGAN, P., KHATIR, H., CAROLAN, C., NERMILLOD, P. Bovine blastocyst production in vitro after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 hours. *J. Reprod. Fert.*, v.109, p. 355-365, 1997.
08. SIRARD, M. A. Temporary inhibition of meiosis resumption in vitro by Adenylate Cyclase stimulation in immature bovine oocytes. *Theriogenology*, v.33, p. 757-767, 1990.
09. SIRARD, M. A., FIRST, N.L. In vitro inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol. Reprod.*, v.39, p. 229-234, 1988.
10. SIRARD, M. A., BILODEAU, S. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes in vitro. *Biol. Reprod.*, v.43, p. 777-783, 1990.
11. SÜSS, U., WÜTHRICH, K. Stages of the first meiotic division observed in bovine oocytes matured "in vitro". *Theriogenology*, v.23, p. 231, 1985.
12. TAKAGI, M., CHOI, H.Y., KAMISHITA, H. Evaluation of fluids from cystic follicles for in vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.50, p. 307-312, 1998.

QUADRO 1 - Frequências das diferentes configurações cromossômicas de acordo com o meio de cultivo (T1 = Talp-hepes e T2 = Ffb) e períodos de exposição (3 e 6 h), em relação ao controle zero hora					
Config. cromossômica <sup>1</sup>	0 hora (controle)	Período de exposição		6 horas	
		3 horas		T1	T2
		T1	T2	T1	T2
VG	33,4 a	5,2 b	14,8 ac	04,8 b	06,7 bc
VGBD	47,5 a	33,8 a	66,2 a	22,2 b	48,8 a
CCI	17,1 a	48,8 b	25,1 a	42,4 b	35,0 a
CCII	02,0 a	12,2 a	06,1 a	30,6 b	09,6 a
Total de oócitos	146	157		185	

Valores com letras diferentes na mesma linha diferem (P<0,05)  
<sup>1</sup> VG = vesícula germinal, VGBD = quebra da vesícula germinal, CCI = condensação cromossômica I, CCII = condensação cromossômica II

QUADRO 2 - Frequência das diferentes configurações cromossômicas de acordo com o meio de cultivo (T1 = Talp-hepes e T2 = Ffb)					
Meio de cultivo	N	Configuração cromossômica			
		VG	VGBD	CCI	CCII
T1	112	14,4 a	35,5 a	36,1 a	13,9 a
T2	230	15,0 a	47,6 b	28,2 a	09,2 a

Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05)