

Maturação "in vitro" de ovócitos bovinos da raça Nelore

("In vitro" maturation of bovine oocytes of Nelore breed)

L.S.A. Camargo^{1,3}, W.F. Sá¹, A.M. Ferreira¹, E.P. Costa²

¹Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (CNPGL)
Rua Eugênio do Nascimento, 610 - Dom Bosco
36038-330 - Juiz de Fora, MG

²Departamento de Veterinária - Universidade Federal de Viçosa

³Bolsista CAPES

RESUMO

Avaliou-se o comportamento de ovócitos de Nelore nos processos de maturação "in vitro", utilizando-se ovócitos de Nelore e de mestiças Holandês x Zebu, aspirados de ovários colhidos em matadouro. Os ovários foram transportados ao laboratório em solução fisiológica (0,9% de NaCl) com antibióticos, à temperatura de 30-34°C. O aspirado foi depositado em um cálice cônico com meio Talp Hapes aquecido a 37°C e foram selecionados ovócitos que apresentavam células do "cumulus" compactas, com no mínimo três camadas e citoplasma homogêneo. Após a seleção, os ovócitos foram lavados no mesmo meio e colocados para cultivo em meio TCM 199 com soro de vaca em cio e FSH em co-cultura de células da granulosa, por 24h em estufa incubadora com 5% de CO₂, 95% de ar atmosférico e temperatura de 39°C. Após cultivo os ovócitos foram fixados, corados e avaliada a taxa de maturação nuclear. A taxa de maturação observada nos ovócitos de Nelore foi de 76,27% (n=118) e nos de mestiças foi 86,53% (n=104). Não houve diferença entre os grupos genéticos, o que demonstra a viabilidade dos gametas de Nelore durante o processo de maturação "in vitro".

Palavras-chave: Bovino, Nelore, maturação "in vitro"

ABSTRACT

The aim of this investigation was to assess the viability of the "in vitro" maturation oocytes of Nelore breed. This study utilized Nelore and crossbreed Holstein x Zebu oocytes, obtained from ovaries at a slaughterhouse. The oocytes were aspirated from follicles with a 3ml syringe, and washed in Talp Hepes medium at 37°C. All oocytes surrounded by cumulus cells were selected, washed again in Talp Hepes medium and cultured in TCM 199 medium with 10% estrus cow serum, 20mcg/ml FSH, 5% CO₂ air, in co-culture of granulosa cells at 39°C, for 24h. After "in vitro" maturation, the oocytes were fixed, stained and evaluated for nuclear maturation. The maturation rate for Nelore and cross breeding Holstein x Zebu oocytes were, respectively, 76.27% (n=118) and 86.53% (n=104). This difference was not significant, showing the viability of these oocytes during the "in vitro" maturation process.

Keyword: Bovine, Nelore, "in vitro" maturation

INTRODUÇÃO

A fecundação "in vitro" apresenta vantagens para a produção de embriões, por permitir o aproveitamento de número expressivo de ovócitos se comparada a outras técnicas, como a transferência embrionária após superovulação. Inúmeros estudos têm sido realizados para se desenvolverem e otimizarem técnicas de maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário "in vitro" de bovinos. Na maioria, esses trabalhos utilizam bovinos de origem européia (*Bos taurus taurus*).

Estudos com ovócitos e embriões de animais zebuínos (*Bos taurus indicus*) são de grande importância, principalmente para países tropicais, uma vez que esses animais são adaptados ao clima e apresentam maior resistência aos carrapatos e às doenças transmitidas por eles e menor exigência nutricional de manutenção, devido ao menor tamanho e ao menor metabolismo basal (Cunningham & Syrstal, 1987).

Avaliando a taxa de maturação "in vitro" em ovócitos de animais da raça Nelore, Oliveira et al. (1994) encontraram média de 53,7% enquanto De Armas et al. (1994) encontraram 84%.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de ovócitos de animais da raça Nelore diante do processo de maturação "in vitro", visando contribuir para o estabelecimento da produção "in vitro" de embriões dessa raça.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ovários de 26 novilhas da raça Nelore, com idades variando entre dois e três anos, e de 23 vacas mestiças Holandês x Zebu com idades variando de três a 12 anos. Os ovários foram colhidos em matadouro distante 35km do laboratório, transportados em solução fisiológica com 0,1g/l de sulfato de estreptomicina, aquecida à temperatura entre 30 e 34°C. O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal da EMBRAPA/CNPGL, em Coronel Pacheco, MG.

Os folículos com diâmetro maior que 1,5mm foram aspirados com seringa de 3ml e agulhas 25 x 7, num período máximo de 3h após a colheita dos ovários. O conteúdo da seringa foi depositado em um cálice cônico com meio Talp Hepes (Bavister et al., 1983) previamente aquecido a 37°C, onde permaneceu por 10 minutos para decantação. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado em meio Talp Hepes. Os ovócitos, localizados por meio de um microscópio estereoscópico, foram novamente lavados e selecionados os que apresentavam as células de "cumulus" de forma compacta, com no mínimo três camadas de citoplasma homogêneo.

Os ovócitos das fêmeas Nelore constituíram o grupo 1 e das mestiças o grupo 2. A maturação "in vitro" foi realizada em placas de Petri com 3ml de meio TCM 199 acrescido de 10% de soro de vaca em cio (SVC) e 20mcg/ml de FSH em cocultura com 2×10^6 de células da granulosa/ml, conforme Costa et al. (1994), em estufa incubadora à temperatura de 39°C, 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico, por 24h.

Após o tempo de cultivo "in vitro" os ovócitos foram desnudados, fixados em lâmina pela técnica descrita por Costa (1994) e corados com orceína a 2% para a avaliação da maturação nuclear em microscópio óptico.

A análise estatística foi realizada pelo teste de Qui-quadrado, segundo Gomes (1977).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 52 ovários colhidos de fêmeas Nelore produziram 213 ovócitos, sendo 158 considerados viáveis (média de 3,03 ovócitos viáveis por ovário). Dos 46 ovários de mestiças foram colhidos 202 ovócitos, dos quais 150 viáveis (média de 3,26 ovócitos viáveis por ovário) (Fig. 1).

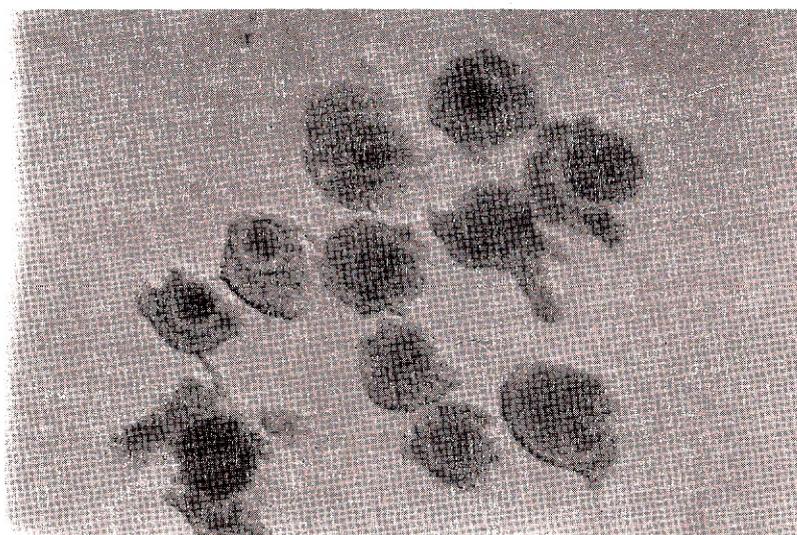


Figura 1. Ovócitos imaturos de bovinos da raça Nelore, logo após a aspiração, apresentando células do "cumulus" compacta, com no mínimo três camadas. 40x.

Após o cultivo para maturação "in vitro", os ovócitos de ambos os grupos apresentaram expansão de suas células de "cumulus", o que é um indicativo morfológico do reinício da meiose e maturação do gameta, sendo importante para a sua viabilidade (Ball et al., 1983; Liu et al., 1991; Sirad & Blondin, 1996). Desse modo, as células do "cumulus" dos ovócitos de fêmeas Nelore e mestiças apresentaram comportamento compatível com a maturação de gametas femininos.

Na Tab. 1 estão os resultados de maturação nuclear encontrados em ovócitos de fêmeas Nelore e mestiças, após serem fixados em lâmina e corados, para observação da presença de cromossomos e corpúsculo polar.

Tabela 1. Taxas de maturação (metáfase II) encontradas com ovócitos de fêmeas Nelore e de mestiças, após 24h de maturação "in vitro".

Grupo genético	n	Metáfase II (%)
Nelore	118	90(76,27)
mestiças	104	90(86,53)

A diferença entre o grupo Nelore e o de mestiças não foi significativa ($P>0,05$)

Os resultados demonstram que ovócitos de Nelore são capazes de alcançar a maturação nuclear após cultivo "in vitro" (Fig. 2). A maturação nuclear dos dois grupos foram condizentes com a expansão das células do "cumulus", o que é um indicativo de que os procedimentos utilizados para o cultivo foram adequados, quando avaliados pela morfologia e presença dos cromossomos e corpúsculo polar nos ovócitos.

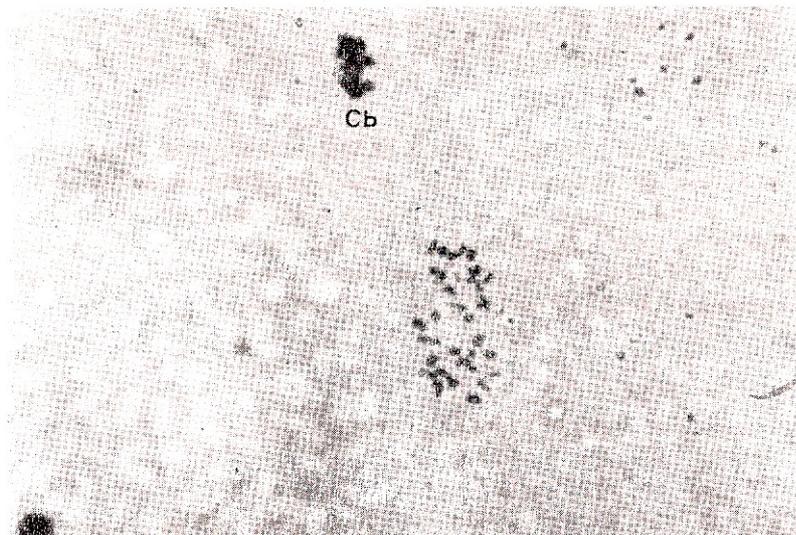


Figura 2. Taxas de maturação (metáfase II) encontradas com ovócitos de fêmeas Nelore e de mestiças, após 24h de maturação "in vitro".

A taxa de maturação nuclear dos ovócitos de fêmeas Nelore foi semelhante ao de mestiças. No entanto, foi superior aos 53,7% obtidos por Oliveira et al. (1994) que utilizaram ovócitos de Nelore, porém semelhante aos 84% obtidos por De Armas et al. (1994). Essa diferença observada nas taxas de maturação pode ser devido a utilização de FSH e 10% de soro de vaca em cio (SVC) no meio de cultivo deste trabalho contra 5% de SVC e ausência de FSH quando comparada com a de Oliveira et al. (1994). Estes fatores são responsáveis pela expansão das células "cumulus" e maturação nuclear (Allworth & Albertini, 1993; Schellander et al., 1994). O SVC deve ter contribuído para o desenvolvimento dos ovócitos nesse experimento, pois é rico em LH, hormônio que desencadeia o processo final de maturação e atua também aumentando a energia avaliável para o ovócito suportar a fecundação e desenvolvimento embrionário subsequente (Brackett & Zuelke, 1993) além de conter fatores de crescimento que são importantes na regulação da maturação do ovócito (Greve & Madison, 1991). Também foi utilizado o co-cultivo com células da granulosa, procurando mimetizar o ambiente celular que ocorre no final da maturação dentro do folículo. Essas células parecem favorecer a capacidade de desenvolvimento do ovócito (Fukui & Ono, 1989).

A utilização do FSH, SVC e co-cultivo com células da granulosa em cultivos de ovócitos imaturos de fêmeas Nelore, assim como de mestiças, produziram resultados semelhantes aos citados em outras raças de origem européia (Fukui & Ono, 1989), demonstrando não haver grandes diferenças no processo de maturação do ovócito.

Os resultados demonstram que ovócitos de Nelore e mestiças são capazes de alcançar a maturação nuclear através dos processos de maturação "in vitro". Os hormônios, co-cultura e os soros usados nesse experimento também podem ser utilizados, contribuindo para a maturação nuclear dos ovócitos. Novos estudos devem ser conduzidos para verificar se ovócitos de Nelore maturados "in vitro" estão aptos para ser fecundados "in vitro" e se desenvolver.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLWORTH, A.E., ALBERTINI, D.F. Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton. *Dev. Biol.*, v.158, p.101-112, 1993.

- BALL, G.D., LEIBFRIED, M.L., LENS, R.W. et al. Maturation and fertilization of bovine oocytes in vitro. *Theriogenology*, v.13, p.112, 1983.
- BAVISTER, B.D., LEIBFRIED, M.L., LIEBERMAN, G. Development of preimplantation embryos on the Golden hamster in a defined culture medium. *Biol. Reprod.*, v.28, p.235-243, 1983.
- BRACKETT, B.G., ZUELKE, K.A. Analysis of factor involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, v.39, p.43-64, 1993.
- COSTA, E.P. *Aspectos morfológicos (citológicos e ultra-estruturais) e desenvolvimento de ovócitos de bovinos "in vitro"*. Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária, 1994. 155p. Tese (Doutorado).
- COSTA, E.P., VALE FILHO, V.R., NOGUEIRA, J.C. et al. Cultivo "in vitro" de ovócitos de bovinos em diferentes sistemas. I- Efeito na maturação nuclear. In: ENCONTRO DE PESQUISA DA ESCOLA DE VETERINÁRIA, 14, 1994, Belo Horizonte, *Anais...*, Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária, 1994. p. 70.
- CUNNINGHAM, E.P., SYRSTAL, O. Types and breeders of tropical and temperate cattle. In: *Crossbreeding Bos indicus and Bos taurus for milk production in the tropics*. Roma: FAO/APHP, 1987. p. 33-37.
- De ARMAS, R., SOLANO, R., RIEGO, E. et al. Use of progeny of Holstein x Zebu cross cattle as oocyte donors for in vitro embryo production and gene microinjection. *Theriogenology*, v.42, p.977-985, 1994.
- FUKUI, Y., ONO, H. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in-vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, v.86, p.501-506, 1989.
- GOMES, F.P. *Curso de estatística experimental*. 7 ed. Piracicaba: Nobel, 1977. 430p.
- GREVE, T., MADISON, V. *In vitro* fertilization in cattle: a review. *Reprod. Nutr. Dev.*, v.31, p.147-157, 1991.
- LIU, J.M., JIN, Z.Q., ZHAO, X.X. et al. The development of bovine follicular oocytes matured in different culture media. *Vet. Res. Commun.*, v.15, p.257-260, 1991.
- OLIVEIRA, E.B., WATANABE, Y.F., GARCIA, J.M. Establishment of an IVF program for Zebu cattle (*Bos indicus*) in Brazil. *Theriogenology*, v.41, p.188, 1994.
- SCHELLANDER, K., FUHRER, F., BRACKETT, B.G. et al. In vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrous cow serum. *Theriogenology*, v.33, p.477-485, 1990.
- SIRARD, M.A., BLONDIN, P. Oocyte maturation and IVF in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.42, p.417-426, 1996.