

Técnica para avaliação do estágio de maturação nuclear de ovócitos bovinos cultivados *in vitro*

(Technic for evaluating nuclear maturation of bovine oocytes cultured in vitro)

E.P. Costa¹, V.R. Vale Filho², J.C. Nogueira³, A.M. Ferreira⁴, A.H.A. Costa⁵

¹Departamento de Veterinária Universidade Federal de Viçosa
Av. P. H. Rolfs, s/n
36571-000 - Viçosa, MG

²Escola de Veterinária - UFMG

³Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

⁴EMBRAPA - CNPGL - Juiz de Fora, MG

⁵Médica Veterinária

RESUMO

Foi desenvolvida uma técnica para avaliação do estágio de maturação nuclear de ovócitos de bovinos, que permitisse clara visualização das configurações cromossômicas. Após aspiração de folículos oriundos de ovários de vacas abatidas em matadouro, os complexos "cumulus-ovócitos" foram lavados e em seguida classificados em categorias quanto ao tipo de envoltório celular. Ovócitos com *cumulus* compacto foram cultivados em diferentes tempos, em meio de cultura de tecido (TCM) acrescido de FSH (2µg/ml), soro inativado de vaca em estro (10%) e células da granulosa em suspensão (2 x 10⁶/ml). Foram analisadas 1.371 lâminas confeccionadas de ovócitos cultivados por 0, 12, 18, 24 e 30 horas. A técnica permitiu clara visualização dos bivalentes na metáfase I e dos monovalentes na metáfase II, mantendo ainda a integridade da configuração cromossômica típica na anáfase I e metáfase II, apesar da hipotonização realizada. Além disso, manteve a disposição dos cromossomos do primeiro corpúsculo polar, quando presente.

Palavras-Chave: Bovino, ovócito, maturação *in vitro*

ABSTRACT

A technique for evaluating the stage of bovine oocyte nuclear maturation was developed. The technique allowed a distinct visualization of the chromosome configuration. After follicular aspiration, the oocytes were classified into categories based on the type of cell surrounding. Only oocytes with compact *cumulus*, cultured over different times, were used in this study. Oocytes were cultured in tissue culture medium (TCM) containing FSH (20µg/ml), inactivated estrous cow serum (10%), and granulosa cell suspension (2×10^6 /ml). A total of 1,371 samples from cultured oocytes during 0, 12, 18, 24 and 30 hours was analyzed. The technique allowed clear visualization of bivalents during metaphase I, and the typical chromosomic configuration of metaphase II, including the arrangement of the chromosome. In addition, the typical arrangement of anaphase I was preserved, even under hipotonization.

Keywords: Bovine, oocyte, *in vitro* maturation

INTRODUÇÃO

Vários procedimentos têm sido descritos para a avaliação da configuração cromossômica de ovócitos, em estudos relacionados com a maturação e fecundação *in vitro* (MIV e FIV). Da mesma forma, diferentes critérios foram adotados para caracterizar a maturação nuclear do ovócito.

Adotando procedimentos que envolviam a inclusão e a microtomia, Akufo et al. (1988) fixaram os ovócitos em solução com 75% de ácido pícrico, 20% de glutaraldeído e 5% de ácido acético. Após a fixação, foram seccionados com seis micrômetros, corados com HE e analisados. Os estádios de maturação foram identificados como: dictióteno, prometáfase, metáfase I, anáfase, telófase e metáfase II.

Para avaliar o estágio de maturação nuclear, Sirard & Bilodeau (1990a, b), Gurevich et al. (1993) adotaram a montagem dos ovócitos entre lâmina e lamínula, com posterior fixação utilizando ácido acético com metanol ou com etanol, na proporção de 75% do álcool. O tempo de fixação utilizado por esses pesquisadores variou de 24 a 48 horas. A orceína foi usada como corante, na concentração de 0,75% a 2%, em solução de ácido acético.

Alguns pesquisadores utilizaram procedimentos similares aos citados anteriormente para avaliação da taxa de fecundação de ovócitos. Desse modo,

Pavlok et al. (1989) e Stubbings et al. (1990) utilizaram a montagem e fixação dos ovócitos conforme descrito. Posteriormente, coraram com aceto-orceína a 1% ou 2%, para avaliar a taxa de ovócitos penetrados pelo espermatozóide e a taxa de formação pronuclear.

O uso de substâncias hipotônicas foi adotado por alguns pesquisadores. Dessa forma, King et al. (1986) adaptaram uma técnica utilizada para zigotos por King et al. (1979), utilizando uma solução de citrato de sódio a 0,88%, para a hipotonização dos ovócitos. A dispersão dos cromossomos foi classificada como boa (cromossomos bem espalhados), regular (cromossomos muito espalhados e/ou muito contraídos) e pobre (o número de cromossomos não pode ser estabelecido devido à pobre dispersão). Em 20 zigotos analisados por King et al. (1979), foram observadas 11 lâminas boas, três regulares, quatro pobres e duas, que não foram classificadas, não apresentavam mitose. Greve et al. (1984) hipotonizando os ovócitos com uma solução de citrato de sódio a 1 %, utilizaram um método de preparação de lâminas similar ao de King et al. (1986). Esses pesquisadores classificaram a maturação nuclear da seguinte forma: estágio de vesícula germinativa, metáfase I, metáfase II e primeiro corpúsculo polar. Bongso et al. (1988) relataram que complementos hipo-haplóides observados em ovócitos de humanos após FIV têm sido o resultado de artefatos devido a perdas cromossômicas durante a execução de métodos tradicionais. Também citaram a necessidade de uma técnica que, além de permitir boa qualidade de metáfases, possibilitasse acurácia na contagem do número de cromossomos. Diante dessas observações, esses pesquisadores descreveram uma técnica para ovócitos de humanos, camundongos e hamsters. Süß et al. (1988) descreveram uma técnica para a preparação de ovócitos de bovinos, após a manutenção desses em solução hipotônica de KCl (0,075 M) por 10 minutos. Esses pesquisadores caracterizaram os seguintes estádios de configuração cromossômica: proeminente nucléolo e muitos finos filamentos de cromatina ao redor do núcleo (VG), longos e finos filamentos cromossômicos, podendo aparecer alguns individualmente, nucléolo tênue quando presente (CI), cromossomos enrolados e nenhum aparecendo individualmente (CII), diacinese (aparência bivalente), anáfase I, telófase I (quando dois grupos cromossômicos foram encontrados) e MII (quando os cromossomos estavam espalhados).

A avaliação do estágio de maturação dos ovócitos é um procedimento necessário em pesquisas de MIV e FIV. Diante disto, objetiva-se, neste trabalho, definir procedimento mais rápido e seguro na avaliação dos ovócitos maturados, que contribua substancialmente para as atividades rotineiras e aprimoramento dessas tecnologias.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ovários de vacas abatidas em matadouro. Imediatamente após o abate e evisceração, os ovários foram removidos e imersos em solução fisiológica a 35-37°C, acrescida de penicilina e estreptomicina (Sirard & Bilodeau, 1990b), levados ao laboratório e lavados três vezes em solução fisiológica.

A aspiração dos ovócitos foi realizada com agulhas 25 X 7, adaptadas em seringas de 5ml. Após a punção dos folículos terciários, com diâmetro mínimo de 1,5mm, o líquido era aspirado e depositado em cálice cônico e com 40ml de meio Talp-Hepes (Bavister et al., 1983) mantido a 38 - 39°C. Após a decantação por cinco minutos, o sobrenadante foi sifonado lentamente para uma placa de Petri. O sedimento foi ressuspenso com meio de Talp-Hepes e transferido para placa de Petri mantida em placa aquecedora, na temperatura de 38°C.

Os complexos "*cumulus* - ovócitos" foram lavados em meio de Talp-Hepes com o auxílio de um microscópio estereoscópio. Os ovócitos apresentando *cumulus* compacto foram co-cultivados com células da granulosa em suspensão (Sirard & Bilodeau, 1990a), em meio de cultura de tecido (TCM) acrescido de substâncias conforme Costa et al. (1994).

Os cultivos foram realizados em placas de Petri de 35 milímetros de diâmetro, com quatro mililitros de meio de cultivo previamente equilibrado durante uma hora a 39°C, em atmosfera de 5% de CO₂, 95% de ar atmosférico e 95% de umidade. Foram retirados 30 a 40 ovócitos em 0, 12, 18, 24 e 30 horas de incubação. Após a remoção mecânica do *cumulus oophorus*, os ovócitos foram submetidos aos procedimentos descritos a seguir: 1- manutenção dos ovócitos desnudados cinco minutos em solução de KCl (0,045 Molar em água destilada); 2- transferência dos ovócitos, juntamente com 15µl da solução hipotônica, para uma lâmina previamente limpa e desengordurada; 3- separação dos ovócitos agrupados, com o auxílio de um microscópio estereoscópio, e aspiração de todo o excesso de líquido através de uma micropipeta, permitindo que os ovócitos fiquem imóveis na lâmina; 4- gotejamento imediato de uma gota (aproximadamente 10µl) de solução de metanol + ácido acético (2:1, v/v) recém-preparada e mantida a 4°C; 5- adição de uma segunda gota do fixador (aproximadamente 10µl), imediatamente após os ovócitos se expandirem; 6- secagem; 7- adição de três a quatro gotas (total aproximado de 30 a 40µl) de solução de metanol e ácido acético (3:1, v/v), mantida a 4°C; 8- secagem; 9- fixação à temperatura ambiente em solução de metanol e ácido acético (3:1, v/v), por um período mínimo de uma hora; 10- coloração por 15 a 30 segundos com

solução de orceína a 2% em solução de ácido acético glacial a 40% em água destilada, acrescida de 1,0g de citrato de sódio (após a adição de orceína, a solução final foi fervida em banho-maria por 20 minutos, filtrada e acondicionada em geladeira, dentro de um frasco de vidro escuro); 11- lavagem cuidadosa em água destilada e secagem ao ar; 12- adição, imediatamente após a secagem, de uma pequena gota de óleo de imersão (2 μ l), cobrindo-a com uma lamínula 22 por 22mm e vedando as margens com esmalte; 13- localização dos ovócitos em aumento de 100 vezes e avaliação em 1.000 vezes, com óleo de imersão; 14- acondicionar as lâminas em temperatura ambiente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 1.371 lâminas confeccionadas pela técnica descrita, a partir de ovócitos maturados *in vitro* por zero, 12, 18, 24 e 30 horas. Esta técnica desenvolvida é diferente do método convencional adotado por vários pesquisadores (Sirard & Bilodeau, 1990a, b; Gurevich et al., 1993). No método convencional, os ovócitos não são hipotonizados previamente. Nesse caso, a preparação mantém a forma tridimensional do ovócito. Desse modo, o conjunto de cromossomos na fase de metáfase I ou metáfase II apresenta-se muito agrupado e também na forma tridimensional, impossibilitando a focalização de todo o conjunto, dificultando a caracterização cromossômica (monovalente ou bivalente).

Pelos métodos convencionais, o diagnóstico do estágio de maturação do ovócito é auxiliado pela presença ou não do primeiro corpúsculo polar (CP). Entretanto, esse procedimento não oferece muita segurança, uma vez que o CP não permanece muito tempo visível, após a sua formação. Apesar de alguns pesquisadores terem utilizado a presença do corpúsculo polar como parâmetro de ovócito maduro (Kastrop et al., 1990), alguns trabalhos têm contraindicado este procedimento. Assim, Greve et al. (1984) verificaram que o CP não estava presente em vários ovócitos com configuração óbvia de metáfase II. Sugeriram que a presença ou ausência do primeiro CP não deve ser usado como parâmetro acurado para avaliar a maturação final do ovócito. Corroborando essas observações, Akufo et al. (1988) relatam que alguns ovócitos em metáfase II não tinham corpúsculo polar e contudo poderiam ter sido tabulados como metáfase I. Da mesma forma, Hyttel et al. (1989) observaram que durante a maturação "*in vitro*", o CP é eliminado entre 18 a 21 horas. Após a eliminação do CP, este fica nos arredores da placa metafásica. Subseqüentemente ele degenera, não sendo mais observado por volta de seis a sete horas. Desse modo, um ovócito já maduro com 18 horas de cultivo poderá não mais apresentar CP com 24 horas, quando geralmente é realizada a confecção das lâminas.

A utilização da técnica desenvolvida permite observar com clareza a condição de bivalência na metáfase I (Fig. 1a). Também foi possível verificar, com detalhes, a configuração cromossômica típica na metáfase II, mantendo inclusive a disposição dos cromossomos do primeiro corpúsculo polar, quando presente (Fig. 1d). O uso de substâncias hipotônicas foi também adotado por alguns pesquisadores para avaliação da maturação de ovócitos (King et al., 1986; Bongso et al., 1988; Süß et al., 1988) e também para análise cromossômica de zigotos (King et al., 1979). Entretanto, os resultados desses pesquisadores não permitiram uma comparação com a técnica desenvolvida, devido à escassez de informações na execução dos procedimentos.

A qualidade das preparações foram mantidas por tempo indefinido, apesar de a coloração ter sido realizada com orceína. A técnica também manteve a integridade da disposição cromossômica típica da anáfase I, apesar da hipotonização realizada (Fig. 1b e 1d). Também ocorreu, esporadicamente, a manutenção parcial dos fusos, apesar do procedimento de hipotonização realizado. Entretanto, a integridade dos fusos ocorreu com maior clareza em procedimentos convencionais de preparação de lâminas, onde não é realizada a hipotonização.

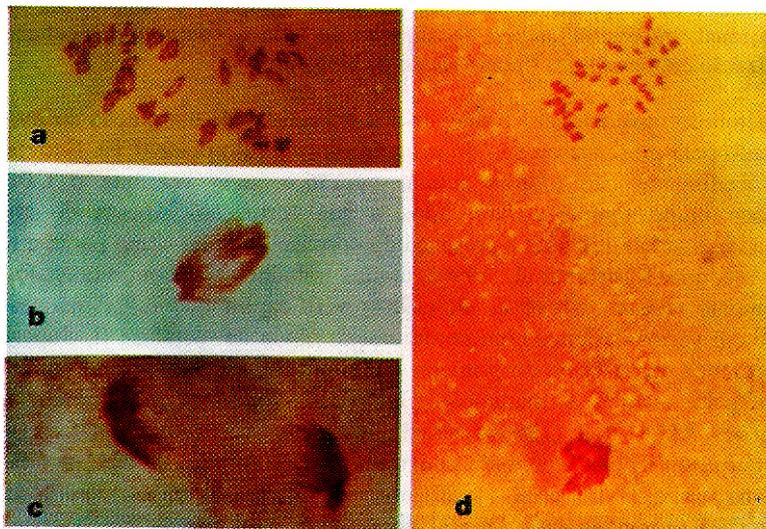


Figura 1. Configurações cromossômicas em diferentes fases, obtidas com utilização da nova técnica desenvolvida para a preparação das lâminas. Metáfase I (bivalentes) de ovócitos bovinos cultivados *in vitro* por 12 horas (a). Início e final de anáfase I em ovócitos bovinos cultivados *in vitro* por 12 horas. (b e c). Metáfase II de ovócito bovino cultivado *in vitro* por 18 horas. CP: conjunto de cromossomos pertencentes ao corpúsculo polar. (d). 1000 X.

No caso de avaliação da taxa de fecundação, a técnica desenvolvida não apresenta vantagens, quando comparada com a rotineira. O diagnóstico de ovócito fecundado é obtido pela observação da presença dos pronúcleos. A utilização da técnica rotineira permite a manutenção dos pronúcleos, o que é uma condição desejável. Além disso, os cromossomos estão descondensados, o que não justifica a utilização de procedimentos de hipotonização. Dessa forma, utilizando procedimentos convencionais sem hipotonização dos ovócitos, vários pesquisadores avaliaram a taxa de fecundação de ovócitos recém-fecundados (Pavlok et al., 1989; Stubbings et al., 1990).

O tempo de fixação é também um fator importante na preparação das lâminas. O diagnóstico rápido e preciso é necessário durante os procedimentos rotineiros de FIV. No caso das técnicas rotineiras, sem o uso de soluções hipotônicas, o tempo de fixação citado na literatura é de no mínimo 24 horas. Isto pode ser explicado pelo fato de permanecer o ovócito intacto, necessitando de um maior tempo para que ocorra a penetração do corante dentro do ovócito. Na técnica desenvolvida, o tempo de fixação é muito curto (uma hora), podendo, inclusive, ser reduzido para um minuto, para um diagnóstico imediato, o que diminui discretamente a qualidade da preparação.

CONCLUSÕES

A técnica desenvolvida permite maior rapidez e segurança na avaliação do estágio de maturação nuclear do ovócito bovino, fator fundamental em estudos comparativos de sistemas de maturação ou fecundação *in vitro*. Também mantém por tempo indefinido a qualidade das preparações coradas pela orceína. Permite observar com clareza a condição de bivalentes na metáfase I, assim como a configuração cromossômica típica na metáfase II. Mantém a disposição dos dois grupos cromossômicos na fase de anáfase I apesar da destruição parcial ou total dos fusos e também a integridade e a distribuição dos cromossomos do primeiro corpúsculo polar, quando presente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKUFO, E., PHELPS, D.A., TIBBITTS, F.D., et al. Influence of follicular components on oocytes meiosis in vitro. *Theriogenology*, v.30, p.643-648, 1988.

- BAVISTER, B.D., LEIBFRIED, M.L., LIEBERMAN, G. Development of preimplantation embryos of the Golden hamster in a defined culture medium. *Biol. Reprod.*, v.28, p.235 - 247, 1983.
- BONGSO, T.A., NG, S.C., RATNAM, S.S. Chromosome preparations from human, mouse and hamster oocytes that prevents chromosome loss by overscattering. *Adv. Contracept. Delivery Syst.*, v.4, p.59-62, 1988.
- 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: 1994. p.70.
- GREVE, T., BOUSQUET, D., KING, W. A., BETTERIDGE, K. J. *In vitro* fertilization and cleavage of *in vivo* matured bovine oocytes. *Theriogenology*, v.22, n. 2, p.151-165, 1984.
- GUREVICH, M., SHEMESH, M., MARCUS, S., et al. *In vitro* fertilization of oocytes obtained from Israeli Friesian cows. *Israel J. Vet. Med.*, v.48, p.84-87, 1993.
- HYTTEL, P., GREVE, T., CALLENSSEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* v.38, p.35-47, 1989.
- KASTROP, P.M.M., BEVERS, M.M., DESTRÉE, O.H.J., et al. Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns during bovine oocyte maturation *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, v.90, p.305-310, 1990.
- KING, W.A., BOUSQUET, D., GREVE, T., et al. Meiosis in bovine oocytes matured *in vitro* and *in vivo*. *Acta Vet. Scand.* v.27, p.267-279, 1986.
- KING, W.A., LINARES, T., GUSTAVSSON, I., et al. Method for preparation of chromosomes from bovine zygotes and blastocysts. *Vet. Sci. Commun.*, v.3, p.51-56, 1979.
- PAVLOK, A., MOTLIK, J., KANKA, J., et al. *In vitro* techniques of bovine oocyte maturation, fertilization and embryos culture resulting in the birth of a calf. *Reprod. Nutr. Develop.*, v.29, p.611-616, 1989.
- SIRARD, M.A., BILODEAU, S. Effects of granulosa cell co-culture on *in vitro* meiotic resumption of bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, v.89, p.459-465, 1990a.
- SIRARD, M.A., BILODEAU, S. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes *in vitro*. *Biol. Reprod.*, v.43, p.777-783, 1990b.
- STUBBINGS, R.B, LIPTRAP, R.M., BETTERIDGE, K.J., et al. Requirements for bovine oocyte maturation *in vitro*. *Reprod. Domest. Anim.*, v.25, p.158-166, 1990.
- SÜSS, U., WÜTHRICH, K., STRANZINGER, G. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured *in vitro*. *Biol. Reprod.*, v.38, p.871-880, 1988.