

# **COMPARAÇÃO DE DUAS TÉCNICAS DE FIXAÇÃO E COLORAÇÃO DE OÓCITOS OBTIDOS POR LAPAROSCOPIA E MATURADOS *IN VITRO* DE FÊMEAS CAPRINAS, ADULTAS E PRÉ-PÚBERES, SUBMETIDAS OU NÃO À ESTIMULAÇÃO HORMONAL.**

Carla Andrade Grillo Beretta, Wilter Ricardo Russiano Vicente, Mabel Freitas Cordeiro, Erlon Gomes de Oliveira Júnior, Deborah Penteado Martins Dias, Maísa Fernanda Campos Minosso, Maria Emilia Franco Oliveira, Paula Alessandra Di Fillipo, Renata Gebara Sampaio Dória. – Medicina Veterinária - Ciências Biológicas - Departamento de Medicina Preventiva e Reprodução Animal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal.

A obtenção dos oócitos é etapa fundamental para a realização da biotécnica de produção *in vitro* (PIV) de embriões em animais domésticos e estes podem ser colhidos *in vitro* de ovários obtidos em abatedouros ou por ovariectomia, ou colhidos *in vivo* por aspiração de folículos utilizando-se métodos de laparotomia, laparoscopia ou via transvaginal guiada por ultra-som (ARMSTRONG *et al.*, 1997). A laparoscopia tem ganhado destaque dentre as técnicas cirúrgicas por ser menos invasiva, comparada a laparotomia, por ter um menor tempo de execução e reduzindo assim o estresse sofrido pelo animal (KÜHHOLZER *et al.*, 1997). Além disso, possui rendimento maior em comparação à colheita de oócitos realizada por ultra-som. Segundo COGNIE (1999), a laparoscopia para aspiração folicular (LAF) aliada a biotécnica de PIV, pode ser alternativa para a superação de problemas de regressão precoce de corpo lúteo, que é a causa da falha de aproximadamente 30% das doadoras caprinas submetidas à múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE). Esta técnica tem sido utilizada para a obtenção de oócitos *in vivo* para uso na pesquisa fundamental e na PIV em caprinos (BALDASSARRE *et al.*, 2002; GRAFF *et al.*, 1999), contudo é ainda pouco difundida. Ovários de abatedouros são fonte de oócitos de menor custo e mais abundante para a produção de embriões em larga escala (MARTINO *et al.*, 1994; WANI *et al.*, 2002). Além disso, esses oócitos fornecem embriões para uma variedade de propósitos de pesquisa, mas o uso dos mesmos é de limitado valor em programas de melhoramento (ARMSTRONG *et al.*, 1997). A obtenção de oócitos de animais vivos é preferível àqueles oriundos de ovários de abatedouro cujo histórico e estado sanitário na maioria das vezes é desconhecido. A maturação, fecundação e cultivo *in vitro* de oócitos, têm maior potencial para elevar a produção de animais geneticamente superiores em relação aos métodos tradicionais de MOTE (TERVIT, 1996). No entanto, técnicas para a obtenção destes oócitos não têm se desenvolvido com a mesma velocidade que a PIV e constitui-se de extrema importância para a maximização desta biotécnica (GRAFF *et al.*, 1999).

A qualidade do oócito recuperado pode ser determinada, entre outras características pela presença ou ausência de células do cumulus. O papel destas células no desenvolvimento completo da competência dos oócitos têm sido investigado (LEIBFRIED & FIRST, 1979). Os estudos mostram que não há maturação ou esta ocorre em menor escala, quando as células do cumulus são removidas antes dos oócitos serem maturados *in vitro* (GONÇALVES *et al.*, 2002). Métodos para a avaliação do grau de maturação de oócitos cultivados *in vitro* têm sido desenvolvidos. Estes têm como objetivo principal verificar a eficiência dos meios de maturação utilizados, podendo assim ajustá-los a cada caso. Para avaliação da maturação nuclear dos oócitos, pode-se utilizar as técnicas de coloração com Hoechst. O Hoechst cora o material nuclear e, este, ao ser observado sob luz ultravioleta (UV), torna-se azul fluorescente, revelando assim a forma em que os cromossomos estão dispostos no núcleo. No entanto, faz-se necessário o uso de um meio viscoso que permita a penetração deste corante na célula e que ao mesmo tempo não danifique e também conserve as estruturas celulares principais. Para tanto, são utilizados o Glicerol ou o Mowiol.

O Glicerol é uma substância bastante conhecida e há muito tempo é utilizada na conservação de células, como por exemplo, na criopreservação de sêmen animal (KUMAR, S. *et al.*, 2003; EHLING, C. *et al.*, 2003). O Mowiol por sua vez, tem a forma de gel e também tem inúmeras aplicações como material primário na indústria, tais como indústrias de tecidos, de produtos adesivos, de papel, de metais, de pintura, de construção e também para a análise de fluorescência. É conhecido que o Mowiol possui uma viscosidade maior do que o Glicerol, fato que interfere na leitura das lâminas para avaliação da maturação nuclear dos oócitos.

Visando comparar as técnicas de fixação e coloração de oócitos, e avaliar a eficiência do uso da LAF, 20 fêmeas caprinas foram submetidas a seis sessões de colheita. As 20 fêmeas foram subdivididas nos seguintes grupos: 10 pré-púberes, sendo 5 com estimulação hormonal (grupo A1) e 5 sem estimulação hormonal (grupo A2); 10 adultas, sendo 5 com estimulação hormonal (grupo B1) e 5 sem estimulação hormonal (grupo B2).

A estimulação ovariana consistiu na administração de 80mg de FSH-P e 300UI de eCG para as cabras adultas, e metade desta quantidade para as pré-púberes. Através de três punções no abdome, foram introduzidos o endoscópio, a pinça atraumática e a agulha de aspiração. Todo o circuito de aspiração (desde a punção dos folículos até a chegada dos respectivos oócitos aspirados no tubo de colheita) foi previamente lavado com meio PBS aquecido e acrescido de Heparina. Os oócitos aspirados foram classificados e submetidos à maturação *in vitro* por 27 horas. Em seguida, foram desnudados, fixados e corados com Hoechst diluído em Mowiol ou Glicerol. Após, no mínimo 24 horas, os oócitos foram observados sob microscópio de epifluorescência para verificar o estágio de maturação nuclear.

O tempo médio das intervenções cirúrgicas foi de 35 minutos. O número de folículos totais puncionados e a taxa de colheita total foram considerados baixos nos grupos estimulados hormonalmente (A1 e B1), visto que a resposta ao protocolo não ocorreu como esperado (Tabela 1). Uma das hipóteses para explicar tal fato, pode ser que o uso frequente de hormônio exógeno pode induzir a formação de anticorpos anti-FSH. Particularmente em caprinos, tratados com FSH de origem porcina, ocorre uma diminuição da resposta ovulatória após a terceira aplicação, causando assim a refratariedade das fêmeas ao tratamento. Outra hipótese é que cerca de 10% das fêmeas caprinas não são responsivas. De acordo com os dados obtidos no presente trabalho, pode-se notar que o número de oócitos encontrados nos grupos (A1 e B1) estimulados com FSH foi maior em relação aos encontrados nas cabras não estimuladas com FSH (grupos A2 e B2).

Tabela 1 – Folículos totais visualizados e puncionados, oócitos totais encontrados, viáveis e maturados e taxa de maturação dos grupos experimentais avaliados. Jaboticabal, 2006.

Grupo	Folículos				Oócitos			Taxa de maturação
	Visualizados		Puncionados					
	OE	OD	OE	OD	Encontrados	Viáveis*	Maturados	
A1	272	230	199	159	187	163	130	79,75%
A2	220	187	143	125	139	108	89	82,41%
B1	234	220	158	152	156	129	85	65,89%
B2	198	190	153	137	130	86	59	68,60%

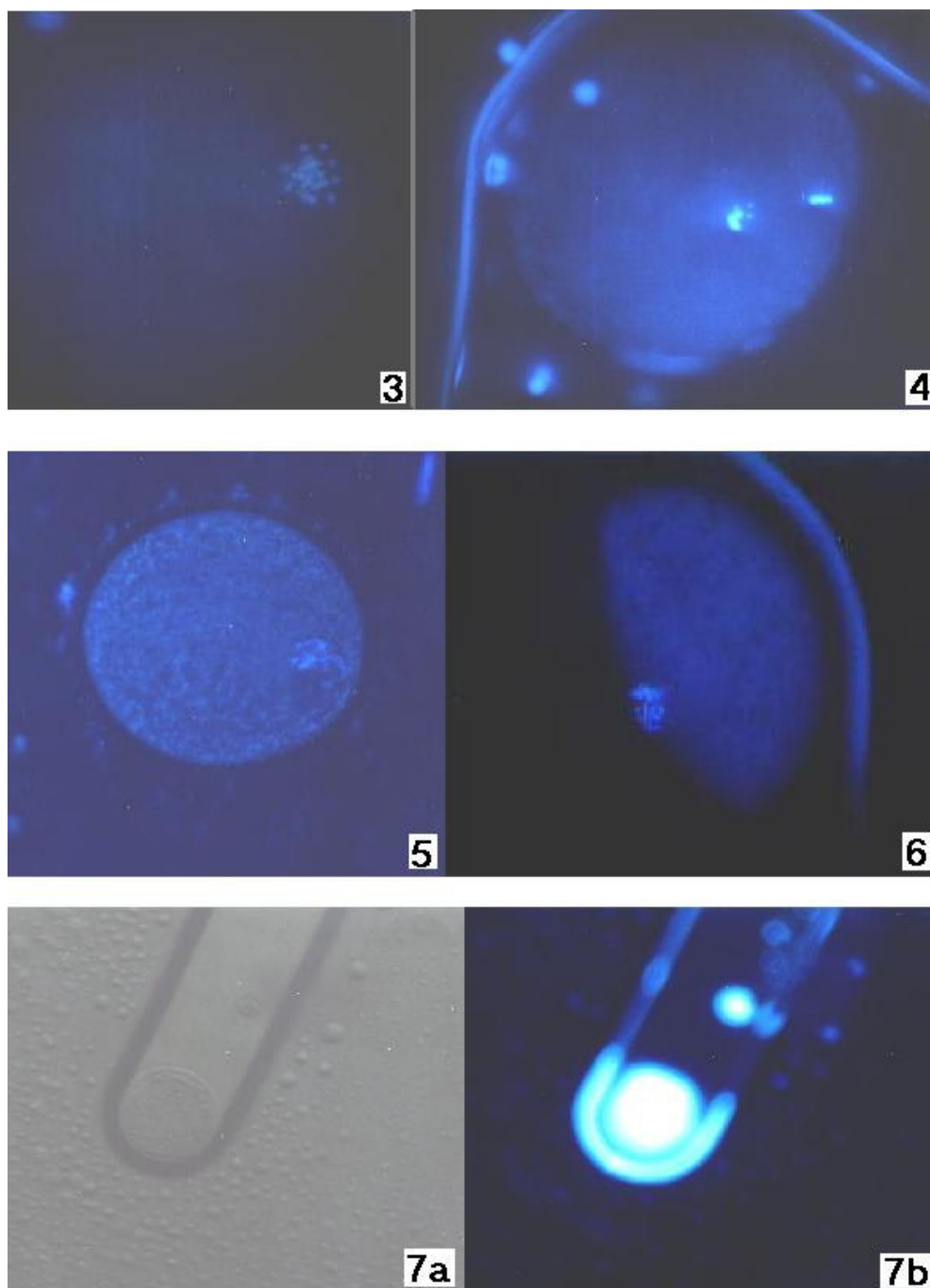
\* Os oócitos considerados viáveis são aqueles classificados do grau I ao III. (OD: Ovário Direito, OE: Ovário Esquerdo; A1 e B1: grupos estimulados hormonalmente, A2 e B2: grupos não estimulados).

A qualidade dos oócitos (percentual de oócitos viáveis) aparentemente não foi prejudicada nem pela pressão do vácuo, nem pelo diâmetro da agulha. Porém, é sabido que a maioria dos oócitos perdem seus cumulus no trânsito do folículo aspirado até o tubo de colheita. As células do cumulus podem ser preservadas por meio do refinamento do vácuo e/ou trabalhar com folículos em estágio mais precoce, os quais têm complexos cumulus-oócito mais compactos. O oócito caprino pareceu demonstrar uma certa fragilidade com relação à pressão do vácuo, pois, com um leve aumento da pressão, no momento da desobstrução das agulhas causada por coágulos de sangue, foram encontrados um maior número de oócitos desnudos.

Foram analisadas cinco fêmeas de cada grupo experimental, totalizando vinte fêmeas, e utilizada para a fixação dos oócitos, as técnicas com Glicerol e Mowiol com Hoechst. Considerou-se como oócitos maturados, aqueles que apresentavam núcleo em Metáfase II, o qual aparecia com o formato da Placa Metafásica (PM) próximo ao Corpúsculo Polar (CP). Dependendo do posicionamento do oócito no momento da fixação, o aspecto da PM mostrava-se de duas formas diferentes (Figuras 3 e 4). Aqueles que não apresentavam a PM foram considerados não maturados (Figura 5). Foram realizadas 120 colorações com Hoescht (vinte cabras e seis intervenções em cada), sendo metade destas feitas com a técnica de coloração Mowiol e a outra metade com Glicerol.

Portanto, em ambas as técnicas, a observação e a avaliação dos oócitos foram possíveis e satisfatórias. Porém, nas diluições feitas com Glicerol foi verificado que houve, em algumas amostras,

modificação no formato dos oócitos (Figura 6) ou recuo no volume da gota (Figura 7a e 7b), fato que dificultou a avaliação dessas lâminas. Já nas diluições feitas com Mowiol não ocorreu o mesmo, facilitando a avaliação, fato que pode ser explicado pela maior viscosidade do Mowiol (dificultando que a gota contendo os oócitos fosse “espalhada” entre a lâmina e a lamínula, interferindo assim, no formato final do oócito a ser observado).



**Figuras 3 e 4** – Oócitos maturados. Fixados em diferentes posições.

**Figura 5** – Oócito não maturado.

**Figura 6** – Oócito com citoplasma retraído.

**Figuras 7a e 7b** – Lâminas apresentando recuo do glicerol,  
**a e b:** sem e com fluorescência, respectivamente.

## Referências Bibliográficas\*

- ARMSTRONG, D. T. Advances in production of embryos in vitro from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. **Reprod. Fertil. Dev.**, East Melbourne, v.9, n.3, p.333-339, 1997.
- BALDASSARRE, H. *et al.* Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. **Theriogenology**, Los Altos, v.57, n.1, p.275-284, 2002.
- COGNIÉ, Y., State of the art in sheep-goat embryo transfer. **Theriogenology**, Los Altos, v.51, n.1, p.105-116, 1999.
- EHLING, C. *et al.* Laparoscopical intrauterine insemination with different doses of fresh, conservation, and frozen semen for the production of ovine zygotes. **Theriogenology**, Los Altos, v., n.1, p.275-284, 2003.
- GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Livraria Varela, p. 179-194, 2002.
- GRAFF, K. J. *et al.* Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following FSH simulation of domestic goats. **Theriogenology**, Los Altos, v.51, n.6, p.1099-1119, 1999.
- KÜHHOLZER, B. *et al.* Repeated endoscopic ovum pick-up in hormonally untreated ewes: a new technique. **Theriogenology**, Los Altos, v.48, n.4, p.545-550, 1997.
- KUMAR, S.; MILLAR, J. D., WATSON, P. F. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. **Criobiology**. Los Altos, v.57, n.1, p.275-284, 2003
- LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. **J. Anim. Sci.**, Savoy, v.48, n.1, p.76-86, 1979.
- MARTINO, A. *et al.* Influence of the collection technique of prepubertal goat oocytes on in vitro maturation and fertilization. **Theriogenology**, Los Altos, v.42, n.5, p.859-873, 1994.
- TERVIT, H. R. Laparoscopy / laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.42, n.1-4, p.227-238, 1996.
- WANI, N. A. *In vitro* maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. **Small Rum. Res.**, Amsterdam, v.44, n.2, p.89-95, 2002.

\*Segundo a ABNT NRB 6023 – Agosto 2002.