

## INFLUÊNCIA DAS GONADOTROFINAS NA REGULAÇÃO DA MATURAÇÃO NUCLEAR DE OÓCITOS EQUÍNOS<sup>1</sup>

### INFLUENCE OF GONADOTROPINS ON NUCLEAR MATURATION OF EQUINE OOCYTES

Juan Manuel Larre Borges<sup>2</sup> Mara Iolanda Batistella Rubin<sup>3</sup> Carlos Antonio Mondino Silva<sup>4</sup>  
Paulo Bayard Dias Gonçalves<sup>4</sup> Ana Cristina Rieck<sup>5</sup>

#### RESUMO

A maturação *in vitro*, fecundação e as técnicas de cultivo de embriões na espécie equina são extremamente importantes e necessárias para se examinar as causas de repetição de cio, redução de concepção em éguas velhas e também para a preservação da espécie equina. Para avaliar o efeito das gonadotrofinas na regulação da maturação nuclear de oócitos equinos, folículos com diâmetro entre 5 a 20mm foram aspirados de 551 ovários provenientes de matadouro obtendo-se 408 oócitos aptos para cultivo. Após a aspiração, os oócitos foram avaliados no próprio líquido folicular quanto a sua integridade e distribuídos nos diferentes tratamentos. No Tratamento 1 (T1) - grupo controle - os oócitos (n=92) foram cultivados em TCM-199 modificado (mod.), com 25mM de HEPES, 2,2mg/ml de bicarbonato de sódio, 1µg/ml 17-β estradiol, 250µM de piruvato de sódio e 0,4% de albumina sérica bovina. No tratamento 2 (T2), os oócitos (n=108) foram cultivados no mesmo meio TCM-199 mod. acrescido de 1µg/ml de hormônio luteinizante suíno (LHs). No Tratamento 3 (T3), os oócitos (n=102) também foram cultivados em TCM-199 mod. porém com 0,5µg/ml de hormônio foliculo estimulante suíno (FSHs) e no Tratamento 4 (T4) os oócitos (n=106) foram cultivados com 1µg/ml de LHs e 0,5µg/ml de FSHs. Os oócitos dos quatro tratamentos foram cultivados em estufa a 39 °C com 5% de

CO<sub>2</sub> e 95% de umidade relativa no ar, durante 24h. Após este período, as células do *Cumulus oophorus* foram removidas e os oócitos fixados em solução de ácido acético glacial-metanol (1:3) em placas de Petri 10 x 35mm por 24h sendo posteriormente corados com aceto-orceína. O percentual de oócitos em telófase I / metáfase II foi de 55,6% (59/106) para o T4 (FSHs/LHs) e de 53,9% (55/102) para o T3 (FSHs), os quais não diferiram significativamente. No entanto, estes percentuais foram significativamente superiores (p<0,05) aos observados no Tratamento 1 (22,8%; 21/92) e no Tratamento 2 (32,4%; 35/108). Estes resultados demonstram que o FSHs estimula a maturação nuclear *in vitro* pois o percentual de oócitos maduros aumentou quando os mesmos foram tratados com FSHs/LHs ou com FSHs somente. O LHs isoladamente, nas concentrações utilizadas, não estimula a maturação nuclear em oócitos equinos.

**Palavras-chave:** oócitos, equinos, gonadotrofinas.

#### SUMMARY

*In vitro* maturation, *in vitro* fertilization and embryo culture in equine are extremely important and necessary for examining reproductive problems in the mare. The aim of the

<sup>1</sup>Financiado pela FAPERGS e Banco Bozano Simonsen S.A. - Parte da Dissertação de Mestrado apresentada pelo primeiro autor ao Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

<sup>2</sup>Médico Veterinário, Aluno do Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária UFSM, Santa Maria, RS.

<sup>3</sup>Médico Veterinário, Doutor, Laboratório de Embriologia e Reprodução Animal, Departamento de Clínica de Grandes Animais (DCGA), Centro de Ciências Rurais (CCR), UFSM, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: mrubin@lince.hcv.ufsm.br. Autor para correspondência.

<sup>4</sup>Médico Veterinário, Doutor, DCGA, CCR, UFSM.

<sup>5</sup>Bolsista do CNPq.

present study was to determine the effect of gonadotropins on nuclear maturation of equine oocytes. Follicles smaller than 20mm were aspirated from 551 ovaries obtained at slaughterhouse, 408 oocytes suitable for culture being recovered. After aspiration, oocytes were evaluated in follicular fluid and distributed in four treatments. In the first treatment, control group, oocytes (n=92) were cultured for 24 hours in modified TCM-199 with 25mM HEPES, 2.2mg/ml sodium bicarbonate, 1µg/ml 17β estradiol, 250µM piruvic acid and 0.4% bovine serum albumin. In the second treatment, oocytes (n=108) were cultured in modified TCM-199 plus 1µg/ml porcine LH. In the third treatment, 102 oocytes were cultured in modified TCM-199 with the addition of 0.5µg/ml porcine FSH and on the fourth treatment oocytes (n=106) were cultured in modified TCM-199 with 1µg/ml porcine LH and 0.5µg/ml porcine FSH. All four groups were cultured for 24h in an atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 39 °C. Afterwards, cumulus cells were removed and oocytes were fixed in acetic acid-methanol (1:3) solution for 24h and stained with aceto-orcein. A significantly greater percentage of MII was observed in oocytes cultured with FSH/LH 59/106 (55.6%) and with FSH 55/102 (53.9%) than in the other groups. When oocytes were cultured in the presence of porcine LH, only 35/108 (32.4%) reached the MII stage, a similar percentage being obtained with the control group. This results demonstrate that equine oocytes cultured *in vitro* are stimulated to reach metaphase II when they are cultured in the presence of porcine FSH alone or added with porcine LH. Otherwise, porcine LH alone does not stimulate nuclear maturation beyond that obtained with oocytes cultured in the absence of gonadotropins.

**Key words:** oocyte, equine, gonadotropins.

## INTRODUÇÃO

Já que os hormônios gonadotrópicos - FSH e LH - participam do processo de maturação *in vivo* dos oócitos, parece razoável que seja necessária sua participação na maturação *in vitro* e, portanto, sua utilização nos meios de cultivo. Em bovinos, trabalhos recentes indicam sua utilização nos meios de cultivo, até em associação com esteróides, havendo no entanto, resultados controversos quando da adição de soro sanguíneo (SAEKI *et al.*, 1991; DOMINKO & FIRST, 1992).

FULKA & OKOLSKI (1981) descreveram pela primeira vez a maturação *in vitro* de oócitos eqüinos, demonstrando que os índices de oócitos maturados aumentam progressivamente após cultivo por 24 (12%) e 48h (68%). Em 1991, BEZARD *et al.* obtiveram o primeiro potro após a fecundação *in vitro* de um oócito maturado *in vivo*. Recentemente e com sucesso, SQUIRES *et al.* (1996) relataram uma prenhez na égua a partir da injeção intracitoplasmática de espermatozóides em oócitos maturados e fecundados *in vitro*.

Na espécie eqüina, a maturação *in vitro* de oócitos tem sido pouco estudada em relação a outros mamíferos. O tempo que envolve cada etapa e o processo de maturação *in vitro* dos oócitos nessa

espécie ainda não se encontra bem definido. LEIBFRIED-RUTLEDGE *et al.* (1987) e SAEKI *et al.* (1991) comparando a maturação *in vivo* com a maturação *in vitro* de oócitos na espécie bovina, observaram que com as técnicas de maturação *in vitro* pode-se obter um número maior de oócitos, porém com menor capacidade de desenvolvimento embrionário. Por estas razões, o estudo dos fatores que influenciam a capacidade de maturação nuclear e citoplasmática dos oócitos são relevantes e válidos também para a espécie eqüina.

Para acelerar o avanço das técnicas de fecundação *in vitro* e transferência intratubárica de gametas (GIFT) na espécie eqüina, se faz necessário um grande número de oócitos. O número limitado de oócitos maduros obtidos *in vivo* leva a obrigatoriedade da utilização de oócitos maturados *in vitro*. Os estudos *in vitro* com oócitos eqüinos demonstram a necessidade de um protocolo eficiente para se alcançar a maturação nuclear e citoplasmática e o tempo requerido para cada estágio de desenvolvimento/maturação. As condições de cultivo deveriam refletir, o mais próximo possível, a situação *in vivo*. O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso do LH e FSH suínos na maturação *in vitro* de oócitos eqüinos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Ovários de éguas (n=551) obtidos no frigorífico Olle Hartwing Equus de Pelotas, RS foram transportados ao laboratório em solução fisiológica 0,9% contendo 100UI/ml de penicilina G-potássica cristalina<sup>a</sup> e 50mg/ml de sulfato de estreptomicina<sup>b</sup>. No laboratório, os ovários foram lavados três vezes na mesma solução antes de se iniciar a coleta dos oócitos. Os folículos com diâmetro desde 5 até 20mm foram aspirados com agulhas 40mm x 12 (18g x 1.1/2") adaptadas a seringas de 20ml decorridas 3 a 4:30h da coleta dos ovários. O líquido folicular contendo os oócitos foi mantido em banho-maria à temperatura de 37°C sendo posteriormente passado em filtro tipo EmCon<sup>c</sup> para facilitar a procura dos oócitos. Após a identificação, os oócitos foram classificados de acordo com a integridade do citoplasma e o número de camadas de células do *Cumulus oophorus*, de acordo com DEL CAMPO *et al.* (1995).

Com o objetivo de se avaliar o efeito das gonadotrofinas suínas na maturação nuclear de oócitos eqüinos, quatrocentos e oito oócitos (408) foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes tratamentos: **Tratamento 1:** Os oócitos foram cultivados em meio TCM-199<sup>d</sup> modificado (mod.) com 25mM de HEPES<sup>e</sup>, 2,2mg/ml de bicarbonato de sódio<sup>f</sup>, 1µg/ml 17β

estradiol<sup>c</sup>, 250µm/ml de piruvato<sup>d</sup> e 0,4% de albumina sérica bovina<sup>c</sup>, na ausência de gonadotrofinas (grupo controle). **Tratamento 2:** Os oócitos foram cultivados em meio TCM-199 mod. contendo 1µg/ml de hormônio luteinizante suíno<sup>g</sup> (LHs). **Tratamento 3:** O cultivo dos oócitos com TCM-199 mod. foi suplementado de 0,5µg/ml de hormônio foliculo-estimulante suíno<sup>g</sup> (FSHs). **Tratamento 4:** O cultivo dos oócitos foi efetuado com TCM-199 mod. com 1µg/ml de hormônio luteinizante e 0,5µg/ml de hormônio foliculo-estimulante suíno.

Os oócitos de todos os tratamentos foram cultivados por 24h em estufa a 39°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada, em gotas de 200µl de meio sob óleo de silicone. Em nenhum tratamento utilizou-se soro no meio de cultivo; este foi substituído por albumina sérica bovina, no intuito de se evitar alterações nas concentrações dos hormônios utilizados. Após o cultivo dos oócitos, as células do *Cumulus oophorus* foram removidas com auxílio de micropipetas de vidro. Os oócitos foram fixados em placas de Petri 10 x 35mm em solução de ácido acético glacial-metanol (1:3) por 24h e corados com aceto-orceína.

Os oócitos corados foram avaliados e classificados em microscópio ótico de acordo com o estágio de maturação nuclear em vesícula germinativa (VG), quebra da vesícula germinativa (QVG), anáfase I (AI), metáfase I (MI), telófase I (TI), metáfase II (MII), degenerados (DEG) ou sem estrutura (SE). O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com 8 repetições, sendo o critério de bloqueamento o dia da coleta. A análise estatística incluiu a análise de variância, pelo método dos quadrados mínimos e estudos de contraste entre as médias dos tratamentos. Os dados foram analisados utilizando-se o programa SAS (1990).

## RESULTADOS

Dos quatrocentos e oito (408) oócitos submetidos à maturação nuclear por 24h, cento e setenta (170) alcançaram os estágios de TI e MII. Observou-se assim, que o maior número de oócitos que alcançaram os estágios de TI (Figura 1) e MII (Figura 2) ocorreu na presença de FSHs/LHs (59/106; 55,6%) durante a maturação. Este maior percentual de oócitos em MII/TI alcançado no tratamento com FSHs/LHs não apresentou diferença significativa com os oócitos tratados somente com FSHs (55/102; 53,9%).

Verificou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de oócitos cultivados em

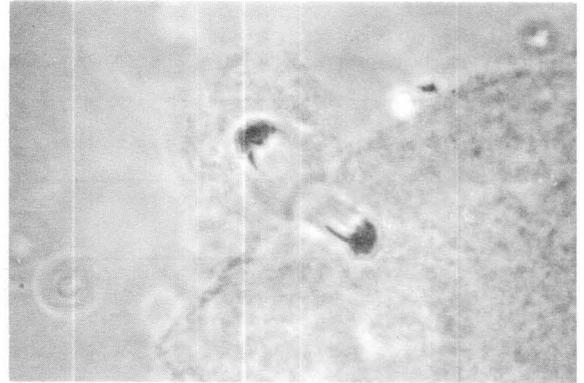


Figura 1 - Oócito eqüino em estágio de telófase I cultivado por 24h em meio TCM-199 modificado acrescido de LHs e FSHs. Corado com aceto-orceína. Aumento 1000x.

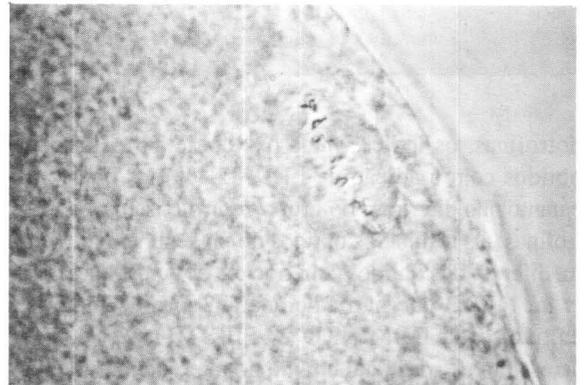


Figura 2 - Oócito eqüino de metáfase II cultivado por 24h em meio TCM-199 modificado acrescido de LHs e FSHs. Corado em aceto-orceína. Aumento 1000x.

meio com FSHs ou com a combinação de LHs/FSHs em relação aos grupos de oócitos cultivados no meio contendo LHs (35/108; 32,4%) ou aos oócitos do grupo controle sem gonadotrofina (21/92; 22,8%). Os dados de frequência obtidos para cada estágio de maturação dos oócitos encontram-se na Tabela 1. Os oócitos classificados nos demais estágios ( $n=238$ ; SE/DEG, VG, QVG, MI/AI) se distribuíram de forma semelhante nos diferentes tratamentos não apresentando diferenças significativas.

## DISCUSSÃO

Os achados mais importantes deste estudo referem-se aos oócitos tratados com LHs/FSHs onde 55,6% deles alcançaram os estágios de TI/MII não havendo diferenças quando comparado com o grupo do FSHs (53,9%). Em se tratando da adição de gona

Tabela 1 - Número de oócitos eqüinos maturados *in vitro* por 24h com gonadotrofinas de origem suína, classificados de acordo com o estágio de maturação nuclear.

TRATAMENTOS	n	MII/TI		MI/AI		QVG		VG		SE/DEG	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Controle	92	21	22,8 <sup>a</sup>	35	38 <sup>a</sup>	12	13 <sup>a</sup>	6	6 <sup>a</sup>	18	20 <sup>a</sup>
LH	108	35	32,4 <sup>a</sup>	41	38 <sup>a</sup>	9	8 <sup>a</sup>	9	8 <sup>a</sup>	13	12 <sup>a</sup>
FSH	102	55	53,9 <sup>b</sup>	23	23 <sup>a</sup>	8	8 <sup>a</sup>	4	4 <sup>a</sup>	12	12 <sup>a</sup>
LH/FSH	106	59	55,6 <sup>b</sup>	23	22 <sup>a</sup>	5	5 <sup>a</sup>	6	6 <sup>a</sup>	13	12 <sup>a</sup>

(p < 0,05) <sup>ab</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas.

MII/TI Metáfase II/ Telófase I

MI/AI Metáfase I/ Anáfase I

QVG Quebra da vesícula germinativa

VG Vesícula germinativa

SE/DEG Sem estrutura / degenerados

dotrofinas, os índices mais baixos de TI/MII foram obtidos com a adição de LHs (32,4%), os quais, no entanto não diferiram do grupo controle, sem gonadotrofinas. Os resultados obtidos no presente experimento, diferem dos obtidos com oócitos bovinos por SÜSS *et al.* (1988) que não adicionaram soro ao meio de cultivo, e de DOMINKO & FIRST (1992) com o acréscimo de soro fetal bovino no meio de maturação. Esses autores concluíram que o LH estimula a maturação *in vitro* de oócitos bovinos, enquanto que a adição de FSH retarda a mesma. Por outro lado, os resultados do presente experimento corroboram com os obtidos com a maturação *in vitro* de oócitos eqüinos por WILLIS *et al.* (1991) os quais observaram que oócitos cultivados por 15 ou 32h com LH bovino ou eqüino isoladamente, não atingiram a maturação nuclear. Da mesma forma, BEZARD & PALMER (1992) constataram que o LH ovino não estimulou a maturação nuclear de oócitos eqüinos *in vitro*. Considerando que WILLIS *et al.* (1991) obtiveram melhores resultados quando utilizaram a associação FSH/LH em relação ao uso isolado de LH e que no presente trabalho não foram constatadas diferenças entre o uso de FSH/LH e FSH isolado, o FSH parece ser mais eficaz do que o LH para desencadear a maturação nuclear *in vitro* de oócitos eqüinos.

Os estudos realizados por BOUSFIELD *et al.* (1987) estabelecem diferenças na estrutura bioquímica das gonadotrofinas eqüinas em relação às das outras espécies. O hormônio luteinizante eqüino possui uma maior quantidade de carboidratos e maior quantidade de ácido siálico por unidade de peso; a sua

subunidade  $\beta$  apresenta 28 aminoácidos a mais e também apresenta atividade de FSH nas outras espécies. Isto faz com que o hormônio luteinizante eqüino seja mais parecido ao FSH que ao LH das outras espécies animais. Devido a esta semelhança seria possível que o FSHs se ligasse aos receptores para LH e exercesse uma ação de LH estimulando a maturação dos oócitos eqüinos *in vitro*.

Existem inúmeras hipóteses que tentam justificar os resultados observados nos experimentos que envolvem a maturação de oócitos eqüinos. É possível que os receptores para o LHe presentes no oócito sejam capazes de reconhecer e se ligar ao LHs mas a ligação não seja capaz de estimular *in vitro* o sistema de segundo mensageiro. As diferenças bioquímicas na composição das subunidades  $\beta$  das gonadotrofinas suína e eqüina também poderiam ter sido a causa dos baixos índices de maturação obtidos com LHs (BOUSFIELD, *et al.* 1987). Para esclarecer estas dúvidas, seria necessário avaliar cada uma destas hipóteses separadamente e comparar a influência do LHs/FSHs e LHe/FSHe na regulação da maturação nuclear de oócitos eqüinos.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que tanto a associação FSHs/LHs ou somente o FSHs estimulam a maturação nuclear *in vitro* de oócitos eqüinos enquanto que a utilização do LHs, na concentração utilizada, não estimula a maturação de oócitos eqüinos *in vitro*. Fica em aberto, em função dos resultados obtidos neste experimento e por outros autores, a realização de estudos futuros sobre a utilização das gonadotrofinas eqüinas nos meios de cultivo para a maturação *in vitro* de oócitos eqüinos.

## AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao Frigorífico Olle Hartwing Equus, de Pelotas (RS) por ter freanqueado suas instalações/animais de abate. Aos Médicos Veterinários Erli de Oliveira Pagliani, Nadir Lopes Madeira e aos funcionários do Frigorífico, o reconhecimento pela disposição e apoio durante todas as coletas do material experimental.

## FONTES DE AQUISIÇÃO

<sup>a</sup>Laboratório WYETH-WHITEHALL Ltda., Via Anchieta Km 14, São Bernardo do Campo, SP.

<sup>b</sup>INLAB, Rua Pedro Ivo, 49.290-050 Porto Alegre, RS.

<sup>c</sup>IMUNO SYSTEM Inc., Spring Valley, W., USA.

<sup>d</sup>CULTILAB, Materiais para Cultura de Células Ltda. - Rua Maria Monteiro, 177 Cambuí 13.025-150 Campinas SP.

<sup>e</sup>SIGMA CHEMICAL Co., P.O.Box 4508, Mo., USA.

<sup>f</sup>MERK S.A. Ind. Químicas - Caixa Postal 70.560 - 22741-970 Rio de Janeiro, RJ.

<sup>g</sup>NATIONAL HORMONE and PITUITARY PROGRAM, Baltimore, Md., USA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEZARD, J., PALMER, E. *In vitro* maturation of horse oocytes from slaughtered ovaries. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 12., 1992, The Hauge. **Proceedings ... The Hauge: INTERNATIONAL ANIMAL REPRODUCTION SOCIETY**, 1992. p. 315-318.

BOUSFIELD, G.R., WAN-KYNG L., HIROMU S. Structural studies on equine glycoprotein hormones. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 18, p. 8610-8620, 1987.

DEL CAMPO, M.R., DONOSO, M.X., PARRISH, J.J. *et al.* Selection of follicles, preculture oocyte ovulation, and duration of culture for *in vitro* maturation of equine oocytes. **Theriogenology**, v. 43, p. 1141-1153, 1995.

DOMINKO, T., FIRST, N.L. Kinetics of bovine oocyte maturation allows selection for developmental competence and is affected by gonadotropins. **Theriogenology**, v. 37, p. 203, 1992.

FULKA, J., OKOLSKI, A. Culture of horse oocytes *in vitro*. **J. Reprod Fert**, v. 61, p. 213-215, 1981.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., CRISTER, E.S., FIRST, N.L. Fertilization potential of follicular oocytes classified by stage of cycle and size of follicles. **Theriogenology**, v. 23, p. 753-759, 1987.

SAEKI, K., *et al.* *In-vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured in serum free medium. **Biol Reprod**, v. 44, p. 256-260, 1991.

SAS **Statistical Analysis System**. versão 6.08, Cary, NC, USA. SAS Institute Inc. 1990.

SQUIRES, E.L. Maturation and fertilization of equine oocytes. **Veterinary Clinics of North America**, v. 12, p. 31-45, 1996.

SÜSS, V., WUTRICH, 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.

WILLIS, P., CAUDLE, A. B., FAYER-HOSKEN, R. A. Equine oocyte *in vitro* maturation influence of sera, time, and hormones. **Mol Reprod Dev**, v. 30, p. 360-8, 1991.

**Ciência Rural**, v. 28, n. 2, 1998.