

INFLUENCE OF MECHANICAL AGITATION AND HYALURONIDASE PERFORMED ON BOVINE OOCYTES AFTER *IN VITRO* FERTILIZATION ON EMBRYO CLEAVAGE AND DEVELOPMENT.

Pereira, R.M., Marques, C.C., Vasques, M.I., Baptista, M.C. e Horta, A.E.M.

Departamento de Reprodução, Estação Zootécnica Nacional - INIA,
Vale de Santarém, Apartado 17, 2000 Vale de Santarém

Summary:

In some studies, it is advised to remove the *cumulus* cells surrounding bovine oocytes after *in vitro* fertilisation (IVF). To accomplish that we compared the use of mechanical agitation by vortex (V) with vortex associated with a 0.1% solution of hyaluronidase (V+Hya). Treatments were performed 22h after *in vitro* insemination, immediately before the transfer of the inseminated oocytes to granulosa monolayers. In experiment I a control group with none of the treatments above (T1, 379 oocytes) was compared with treatment V (n=345). In experiment II a control group (T2, n=444) was compared with treatment V+Hya (n=440). The effect of treatments above on cleavage rates, day 8 (D8) and hatched embryos production, and embryo quality was evaluated.

Cleavage rate, assessed 24 hours after oocyte transfer to monolayers, was not affected by V treatment (T1 = 79.4% vs. V = 74.8 %, $P>0.05$) but was significantly reduced by V+Hia treatment (T2 = 83.8% vs. V+Hya = 78.2%, $P<0.05$). None of the above treatments influenced the percentage of D8 and hatched embryos. However, the percentage of grade 2 embryos with 8 days old (good quality embryos) was significantly decreased by V+Hia treatment (33.7% vs. 22.11%; $P<0.067$).

Results above suggest that oocyte cleavage rate and D8 embryo quality are impaired by mechanical agitation of oocytes with vortex plus hyaluronidase but not with vortex alone.

INFLUÊNCIA DA AGITAÇÃO MECÂNICA E DA HIALURONIDASE NO TRATAMENTO DE OÓCITOS BOVINOS APÓS A INSEMINAÇÃO *IN VITRO* SOBRE A CLIVAGEM E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES.

Pereira, R.M., Marques, C.C., Vasques, M.I., Baptista, M.C., Horta, A.E.M.

Departamento de Reprodução, Estação Zootécnica Nacional - INIA,
Vale de Santarém, Apartado 17, 2000 Vale de Santarém

Sumário

Depois da fertilização *in vitro* de oócitos bovinos, em determinadas situações é necessário proceder à remoção das células do *cumulus* que os rodeiam. Comparou-se a acção da agitação mecânica utilizando somente o vortex (V) e a agitação mecânica com vortex associada a uma solução a 0.1% de hialuronidase (V+Hia), na remoção das células do *cumulus* de oócitos bovinos, maturados e fertilizados *in vitro*, e na produção de embriões em co-cultura com monocamadas de células da granulosa. A transferência para as monocamadas, essencial ao desenvolvimento embrionário, efectuou-se 22h depois da inseminação, imediatamente após terem sido submetidos aos seguintes tratamentos: Exp. I - testemunha, sem tratamento (T1, n=379) vs. V (n=345) e, Exp. II - testemunha (T2, n=444) vs. V+Hia (n=440).

A taxa de clivagem, avaliada 24 horas após a transferência dos oócitos inseminados para as monocamadas, foi significativamente afectada pelo tratamento V+Hia (T1 = 79,41% vs. V = 74,78 %, $p > 0.05$; T2 = 83,78% vs. V+Hia = 78,18%, $P < 0.05$). A taxa de embriões em D8 e extrusados em D12 e D13, não foi significativamente afectada por nenhum dos tratamentos. No entanto, a taxa de embriões em D8 com boa qualidade (grau 2) foi significativamente inferior após o tratamento com V+Hia (33,67% vs. 22,11%, $P = 0,067$).

Estes resultados sugerem que a associação da agitação mecânica (vortex) com a hialuronidase no tratamento dos oócitos compromete a clivagem e a qualidade dos embriões obtidos.

Trabalho parcialmente financiado pelo projecto PRAXIS/3.2/AGR/01/94

Introdução

A remoção das células do *cumulus oophorus* que rodeiam o oócito, tem sido experimentada em bovinos com vários objectivos relacionados com as técnicas de produção de embriões *in vitro*.

A remoção destas células é necessária para a cultura de embriões sem células (avaliação do metabolismo do embrião), utilização de monocamadas celulares que não as da granulosa (para evitar a invasão da cultura), injeção espermática intra-oocitária, clonagem e outras micro-manipulações (Gordon, 1994, Goto et al., 1994). Têm sido utilizados vários métodos com o objectivo de separar o complexo *cumulus*-oócito, entre os quais se destacam os agentes mecânicos (pipetagem e agitação mecânica por vortex) e químicos (hialuronidase e citrato de sódio).

Neste trabalho comparou-se o efeito da agitação mecânica (vortex) isoladamente ou associada a uma solução com hialuronidase, 22 h após a fertilização *in vitro*, na produção de embriões bovinos.

Material e métodos

Os oócitos foram recolhidos de ovários provenientes de vacas abatidas em matadouro e maturados *in vitro* durante 22-24 horas segundo a técnica descrita por Marques et al. (1997a,b). Os oócitos maturados foram inseminados com sémen descongelado e previamente submetido à um tratamento por *swim-up* (Pereira et al., 1997).

Vinte e duas horas após a fertilização, imediatamente antes da transferência dos oócitos inseminados para o meio de cultura de embriões com monocamadas de células da granulosa, procedeu-se à remoção das células do *cumulus* em duas experiências:

Experiência I - Grupo testemunha sem remoção das células (391 oócitos inseminados) e grupo com agitação mecânica com vortex durante 1 minuto utilizando 345 oócitos inseminados (V).

Experiência II - Grupo testemunha (444 oócitos inseminados) e um grupo (V+Hia, n=440) com agitação mecânica numa solução de TCM com 0,1% de hialuronidase (Goto et al., 1994), durante 1 minuto seguindo-se três lavagens com meio de cultura.

O efeito dos dois tratamentos em cada uma das experiências foi comparado relativamente à percentagem de embriões clivados às 48h pós inseminação, embriões obtidos ao 8º dia (D8) e embriões extrusados. A qualidade dos embriões em D8 foi avaliada através de uma classificação pontuada de grau 1 a grau 4 (1-excelente, 4-mau), e comparada entre os tratamentos pelo método do qui-quadrado (StatSoft Inc., 1995).

Resultados

Na experiência I, não se observaram diferenças significativas entre o grupo tratado (V) e testemunha relativamente à taxa de clivagem, embriões em D8 e embriões eclodidos (Tabela 1).

Tabela 1. Influência dos tratamentos sobre as taxas de clivagem, embriões de D8 e extrusados

	Oócitos inseminados	Clivados		Embriões D8		Extrusados	
		n	%	n	%	n	%
Experiência I							
Testemunha	391	301	76,98	55	21,59	35	63,63
Vortex	345	258	74,78	50	21,31	37	74,0
χ^2		P>0,05		P>0,05		P>0,05	
Experiência II							
Testemunha	444	372	83,78 ^a	98	26,34	52	53,06
Vortex + Hia	440	344	78,18 ^b	104	30,23	60	57,69
χ^2		P<0,05		P>0,05		P>0,05	

Na experiência II, os oócitos tratados (V+Hia) apresentaram uma taxa de clivagem significativamente inferior à do grupo testemunha (Tabela 1). Este tratamento não interferiu com a taxa de embriões em D8 nem de extrusados.

O tratamento com vortex não interferiu na qualidade dos embriões em D8 (Experiência I, Tabela 2). Contudo, a associação da hialuronidase com a agitação mecânica resultou na diminuição significativa de embriões de boa qualidade (grau 2), quando comparada com o grupo testemunha.

Tabela 2. Influência dos tratamentos sobre a qualidade dos embriões com oito dias de idade.

	Embriões em D8 (n)	Distribuição da classificação (%)			
		Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
Experiência I:					
Testemunha	65	3,07	32,31	43,08	21,51
Vortex	55	0	25,46	43,64	30,91
χ^2		P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05
Experiência II:					
Testemunha	98	5,1	33,67 ^a	40,82	20,41
Vortex + Hia	104	4,81	22,12 ^b	44,23	28,85
χ^2		P>0,05	P≤0,067	P>0,05	P>0,05

Discussão

Contrariamente ao que sucede *in vivo*, onde as células do *cumulus* se separam rapidamente após a ovulação, a dispersão destas e das células da *corona* após a maturação *in vitro* não se verifica.

Vários estudos são unânimes relativamente ao papel essencial das células do *cumulus* durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos (Hyttel et al., 1997). Relativamente à fertilização *in vitro*, a remoção das células diminui a taxa de clivagem dos oócitos, embora a taxa de penetração dos espermatozóides se revele superior (Bottcher et al., 1990). Segundo estes autores o efeito negativo sobre a fertilização parece dever-se a defeitos provocados no ooplasma e zona pelúcida. Por outro lado Cox (1991), não encontrou efeitos negativos do tratamento mecânico para remoção das células do *cumulus*.

Para Miller et al. (1991) existe uma diminuição da taxa de fertilização de oócitos submetidos a tratamento com hialuronidase, a qual parece ser devida à contaminação com tripsina das preparações daquele enzima, visto terem conseguido contrariar aquele efeito negativo através da utilização de inibidores específicos da tripsina.

Os nossos resultados concordam com os de Cox (1991), visto que não se observaram efeitos negativos da agitação mecânica por vortex nem sobre a taxa de clivagem, nem sobre a qualidade dos embriões obtidos. É provável que os efeitos negativos verificados com o tratamento à base do vortex+hialuronidase nas taxas de clivagem e qualidade dos embriões em D8

seja devida ao efeito da contaminação por tripsina referido por Miller et al. (1991).

Os resultados obtidos, concordando com os de outros autores, desaconselham a utilização de soluções enzimáticas como a hialuronidase no tratamento de oócitos bovinos maturados e fertilizados *in vitro* para remoção das células do *cumulus oophorus*.

Bibliografia

- Bottcher, M., Blottner, S., Kruger, S., Rettig, B., Lange, W. (1990). The effect of *cumulus oophorus* on the fertilization *in vitro* of mature oocytes of cattle. Arch Exp Veterinarmed, 44: 53-57.
- Cox, J.F. (1991). Effect of the *cumulus* on *in vitro* fertilization of *in vitro* matured cow and sheep oocytes. Theriogenology, 35: 191.
- Gordon, I. (1994). Laboratory Production of Cattle Embryos. Ed. Ian Gordon, Biotechnology in Agriculture Nº 11, CABI, Cambridge.
- Goto, K., Iwai, N., Ide, K., Takuma, Y., Nakanishi, Y. (1994). Viability of on-cell bovine embryos cultured *in vitro*: comparison of cell-free culture with co-culture. J. Reprod. Fert., 100: 239-243.
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., Greve, T. (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. Theriogenology, 47: 23-32.
- Marques, C.C., Pereira, R.M., Vasques, M.I., Baptista, M.C., Horta, A.E.M. (1997a). Efeito das prostaglandinas sobre a maturação *in vitro* de oócitos bovinos. 1º Congresso Ibérico de Reprodução Animal, 3-6 de Julho, Estoril.
- Marques, C.C., Pereira, R.M., Vasques, M.I., Baptista, M.C., Horta, A.E.M. (1997b). Influência da refrigeração de ovários dadores na produção de embriões bovinos e cultura de células da granulosa *in vitro*. 1º Congresso Ibérico de Reprodução Animal, 3-6 de Julho, Estoril.
- Miller, G.F., Lester, M.B., Gliedt, D.W., Rakes, J.M., Rorie, R.W. (1991). Addition of trypsin inhibitor to hyaluronidase preparations used for oocyte *cumulus* cell removal prior to *in vitro* fertilization improves the subsequent embryo cleavage rate. J. Anim. Sci., 69(Suppl.1): 47.
- Pereira, R.M., Vasques, M.I., Marques, C.C., Batista, M.C., Horta, A.E.M. (1997). Efeito do soro de vacas em cio superovuladas sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos e a síntese de progesterona por monocamadas de células da granulosa. 1º Congresso Ibérico de Reprodução Animal, 3-6 Julho, Estoril.
- StatSoft Inc., (1995). STATISTICA for Windows (computer program manual). Tulsa, OK.