

EFFECT OF OESTROUS COW SERUM FROM SUPEROVULATED ANIMALS ON *IN VITRO* BOVINE EMBRYO PRODUCTION AND ON PROGESTERONE SYNTHESIS OF GRANULOSA CELL MONOLAYERS.

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

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

Summary:

The effects of two types of oestrous cow serum added to *in vitro* culture media (OCS - natural oestrus; SOCS - superovulated oestrus) on embryo production co-incubated with granulosa cell monolayers, were studied. Both sera were collected 24 hours after the onset of heat. The following parameters were evaluated and compared: oocyte maturation, oocyte cleavage rate after IVF, percentage of D8 and hatched embryos, embryo development rate between 7th and 9th days of culture, D8 embryo quality (ranging from 1-excellent and 4-poor), and progesterone production by granulosa cell monolayers.

The rates of oocyte maturation, cleaved oocytes, D8 and hatched embryos were not different between OCS and SOCS groups. Within D7 embryos there was significantly more expanded embryos in SOCS than in OCS (54.8% vs. 38.9%, respectively, $P < 0.055$) and less embryos in the blastocyst stage (9.6% vs. 22.2%, respectively, $P < 0.037$). Within classes of D8 and D9 embryos there was only a tendency for the proportion of embryos in later stages of development being higher in the SOCS group. At D8, the proportion of grade 1 embryos was significantly higher in SOCS than in OCS group (13.1% vs. 1.4%, respectively, $P < 0.007$). Concerning progesterone production by granulosa monolayers, the concentration found beyond 4 days of culture was significantly higher in SOCS than in OCS group.

The results above show that the addition of oestrous cow serum from superovulated animals (SOCS) to the culture media, when compared with normal oestrous cow serum (OCS), accelerates the growth rate of *in vitro* co-cultured embryos and improves the quality of D8 blastocysts. This effect seems to be related to a higher luteinizing effect of SOCS on granulosa cell monolayers, suggesting a direct or mediated effect of luteotrophic substances present in SOCS on a faster embryo growth and better quality of transferable embryos.

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.

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

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

Sumário:

Comparou-se o efeito do soro sanguíneo de vacas em cio natural (OCS) ou após superovulação (SOCS), quando adicionados aos meios de cultura, sobre a produção de embriões em co-cultura com monocamadas de células da granulosa. Ambos os soros foram colhidos 24 horas após o início do cio. O efeito dos dois tipos de soros utilizados foi comparado relativamente à maturação do oócito, clivagem após a fertilização *in vitro*, proporção de embriões obtidos ao 8º dia e de embriões extrusados, velocidade de crescimento embrionário entre o 7º e 9º dias de cultura, qualidade dos embriões em D8 (excelente = grau 1; mau = grau 4), e produção de progesterona pelas células da granulosa.

A suplementação com SOCS ou OCS não se traduziu em diferenças significativas quanto às percentagens de maturação oocitária, de fertilização, de embriões obtidos em D8 ou extrusados. Ao 7º dia de cultura, o grupo suplementado com SOCS apresentou significativamente mais embriões em estadio de blastocito expandido (54,8% vs. 38,9%; $P < 0,055$) e menos em estadio de blastocito (9,6% vs. 22,2%; $P < 0,037$) do que o grupo suplementado com OCS. Nos dias 8 e 9, manteve-se a tendência para haver uma maior proporção de embriões em estadios mais avançados no grupo suplementado com SOCS. Ao 8º dia de cultura, os embriões suplementados com SOCS mostraram uma qualidade superior do que os do grupo OCS, traduzindo-se por um aumento significativo da taxa de embriões de grau 1 (13,1% vs. 1,4%; $P < 0,007$). Nas culturas suplementadas com SOCS, houve uma maior produção de progesterona por parte das células da granulosa a partir do 4º dia de cultura.

Os resultados demonstram que o soro sanguíneo de vacas em cio superovuladas (SOCS), quando comparado com o de vacas em cio espontâneo (OCS), acelera o crescimento dos embriões *in vitro* em co-cultura com células da granulosa e melhora a qualidade dos blastocitos obtidos em D8. Este efeito apareceu associado a um aumento do estímulo luteinizante do SOCS sobre as células da granulosa, sugerindo uma participação directa ou mediada dos factores luteotróficos presentes naquele tipo de soro sobre o crescimento e qualidade dos embriões.

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

Introdução

Os sistemas de produção *in vitro* de embriões bovinos encontram-se ainda numa fase em que o rendimento da técnica é baixo e com grandes variações.

Tem-se verificado que é necessária a presença de hormonas e factores de crescimento nos meios de cultura. Assim, no caso da maturação do oócito, encontramos unanimidade quanto à importância das gonadotrofinas e substâncias com acção gonadotrófica. Já em relação ao

crescimento embrionário, a presença destas hormonas não se tem revelado essencial, havendo neste caso uma maior importância dos factores de crescimento (Gordon, 1994).

Com frequência utilizam-se vários soros de bovino na suplementação dos meios de cultura, como o soro de feto bovino (FCS), de vaca em cio (OCS) e de touros castrados (SS), para suprir as carências anteriormente referidas. Um dos problemas relacionados com a utilização destes soros é a grande variabilidade encontrada entre lotes diferentes (Bavister et al., 1992). Neste trabalho pretendeu-se estudar a influência do soro de vacas em cio submetidas previamente a um tratamento de superovulação (SOCS) em todas as fases da produção *in vitro* de embriões bovinos. Por outro lado, procurou-se saber qual a influência deste tipo de soro sobre o grau de luteinização das monocamadas de células da granulosa utilizadas na co-cultura dos embriões.

Materiais e Métodos:

Produção de soros:

1. Soro de vaca em cio pós superovulação (SOCS) - O ciclo das vacas dadoras de soro foi sincronizado através de um tratamento progestagénico durante 10 dias (implante sub-cutâneo com norgestomet: método Crestar). A superovulação foi induzida pela administração de FSH porcina (Folltropin) na dose i.m. de 50 mg, duas vezes por dia, durante 4 dias com início 3 dias antes da remoção do tratamento progestagénico. O sangue foi colhido na veia jugular 24 h após o início do cio, as amostras foram mantidas a 4°C durante 24 horas e o soro recolhido após a retracção do coágulo. O soro foi tratado a 56°C durante 30 minutos (tindalização), centrifugado, filtrado (porosidade 0,45 µm) e dividido em alíquotas conservadas a -30°C até à utilização.
2. Soro de vaca em cio (OCS) - O OCS sofreu o mesmo tratamento que o anterior, com a diferença de ter sido recolhido 24 horas após o início de cios espontâneos.

Meios de cultura:

1. Maturação dos oócitos - TCM 199 (Gibco) e antibióticos (penicilina e estreptomicina, SIGMA) e soro de vaca em cio (10% v/v) com osmolaridade de 300 mOsm/kg.
2. Cultura de células da granulosa e embriões - Igual ao anterior mas com osmolaridade ajustada a 292 mOsm/kg.

Experiência 1. Efeito do OCS e SCOS sobre a cultura *in vitro* de embriões bovinos (7 repetições):

Os oócitos foram recolhidos de ovários obtidos de vacas recém-abatidas em matadouro. Após a colheita, os ovários foram transportados até ao laboratório à temperatura de 37°C em PBS (0,15% de albumina sérica bovina-p/v e 0,05 mg/ml de sulfato de kanamicina). Os oócitos foram recolhidos a partir de folículos de 2-6 mm de diâmetro e colocados em cultura no meio descrito anteriormente ao qual se adicionou OCS (n=631) ou SOCS (n=618) numa percentagem de 10%. A incubação a 39°C em atmosfera com 5% de CO₂ e saturada de humidade realizou-se durante 22-24 horas, para permitir a maturação do oócito (avaliada a fresco). Após este período, os oócitos maturados foram inseminados (1x10⁶ spz/ml) com sémen de bovino descongelado e submetido a um processo de capacitação *in vitro* em meio TALP com cafeína (485,5 µg/ml). Os

oócitos e os espermatozóides co-habitaram no meio de fertilização durante 22 horas. Nesta altura transferiram-se para o meio de cultura de embriões (100 µl) contendo células da granulosa em monocamada com 48 h de cultura. Quarenta e oito horas depois da fertilização *in vitro* se ter iniciado, procedeu-se à verificação e contagem dos oócitos clivados, que prosseguiram o seu desenvolvimento *in vitro* até à fase de extrusão. Também o meio de cultura dos embriões teve os dois tipos de suplementação (OCS e SOCS). O efeito dos dois tipos de soros utilizados foi comparado relativamente à maturação do oócito, clivagem após a fertilização *in vitro*, proporção de embriões obtidos ao 8º dia e de embriões extrusados, velocidade de crescimento embrionário entre o 7º e 9º dias de cultura (através do estadio de desenvolvimento em cada dia) e qualidade dos embriões em D8 (excelente = grau 1; mau = grau 4), utilizando o método do qui-quadrado (StatSoft inc., 1995).

Experiência 2. Efeito da suplementação com OCS e SOCS na produção de progesterona por parte de culturas de células da granulosa em monocamada:

Comparou-se o efeito do OCS (n=4) e SOCS (n=5) sobre a produção de progesterona, por células da granulosa em cultura sem embriões durante 14 dias. Os ovários dadores das células foram acondicionados a 4°C desde a colheita em matadouro até ao processamento no laboratório (Marques et al., 1997). As células foram suspensas em meio de cultura TCM 199 (com 10% de OCS ou SOCS) numa concentração inicial de 1×10^6 /ml. A progesterona (P4), doseada por RIA em fase sólida (Vasques, 1990, Vasques et al., 1997), apresentou concentrações negligenciáveis em ambos os soros, antes de serem adicionados ao meio. Esta hormona foi doseada no meio de cultura nos dias 0, 2, 4, 7, 9, 11 e 14, a partir de amostras de 50 µl retiradas durante o refrescamento dos meios e as concentrações encontradas para cada dia foram comparadas entre os grupos, por análise de variância (StatSoft inc., 1995).

A LH foi doseada por EIA segundo um método descrito anteriormente (Cavaco Gonçalves et al., 1997) tendo apresentado concentrações baixas e idênticas nas amostras de ambos os soros.

Resultados:

A suplementação com SOCS ou OCS não se traduziu por diferenças significativas quanto às percentagens de maturação oocitária, de fertilização, de embriões obtidos em D8 ou extrusados (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito do tipo de soro na suplementação dos meios de cultura sobre a taxa de maturação dos oócitos, fertilização e desenvolvimento embrionário (7 réplicas).

	Maturação		Clivagem		Embriões D8		Extrusados	
	n	%	n	%	n	%	n	%
SOCS	618	82,4	509	77,0	392	21,4	84	64,3
OCS	631	81,1	512	72,9	373	18,8	70	54,3
χ^2		P≤0,576		P≤0,125		P≤0,359		P≤0,208

Os meios suplementados com SOCS provocaram uma aceleração do crescimento dos embriões em D7 (mais 15,9% de blastocitos expandidos, Tabela 2). Assim, observa-se que ao 7º dia de cultura, o grupo suplementado com SOCS apresentou significativamente mais embriões em estadio de blastocito expandido (54,8% vs. 38,9%; $P < 0,055$) e menos em estadio de blastocito (9,6% vs. 22,2%; $P < 0,037$) do que o grupo suplementado com OCS. Nos dias 8 e 9, manteve-se a tendência para haver uma maior proporção de embriões em estadios mais avançados no grupo suplementado com SOCS.

Tabela 2. Influência dos tratamentos sobre o estadio de desenvolvimento embrionário de D7 a D9 (M = mórula, JBL = jovem blastocisto, BL = blastocisto, BLE = blastocisto expandido, EXT = extrusados; 7 réplicas).

<i>Dia 7</i>	(n)	M (%)	JBL (%)	BL (%)	BLE (%)
SOCS	73	21,91	14,0	9,58	54,79
OCS	72	23,61	15,0	22,22	38,89
χ^2		$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P \leq 0,037$	$P \leq 0,055$

<i>Dia 8</i>	(n)	JBL (%)	BL (%)	BLE (%)	EXT (%)
SOCS	84	2,38	13,09	77,38	7,14
OCS	70	14,28	27,14	65,57	2,85
χ^2		$P > 0,05$	$P \leq 0,028$	$P > 0,05$	$P > 0,05$

<i>Dia 9</i>	(n)	BL (%)	BLE (%)	EXT (%)
SOCS	84	1,19	72,61	26,19
OCS	73	12,32	71,23	16,43
χ^2		$P \leq 0,004$	$P > 0,05$	$P > 0,05$

Relativamente à qualidade dos embriões com 8 dias de idade (idade de transferência) verificou-se que no grupo recebendo SOCS houve mais 11,7% de blastocitos de excelente qualidade (grau 1) quando comparado com o grupo OCS ($P \leq 0,007$, Tabela 3)

Tabela 3. Influência dos tratamentos sobre a qualidade dos embriões de D8

	Embriões em D8 (n)	Distribuição da classificação (%)			
		Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
SOCS	84	13,09	40,0	29,76	16,67
OCS	70	1,42	46,0	35,71	17,14
χ^2		$P \leq 0,007$	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$

Na 2ª experiência verificou-se que o SOCS provocou um aumento do grau de luteinização das células da granulosa quando comparado com o grupo OCS. Com efeito, no grupo SOCS, as células da granulosa produziram significativamente mais progesterona (mais do dobro) a partir do 4º dia de cultura em comparação com o grupo OCS (Tabela 4, Figura 1).

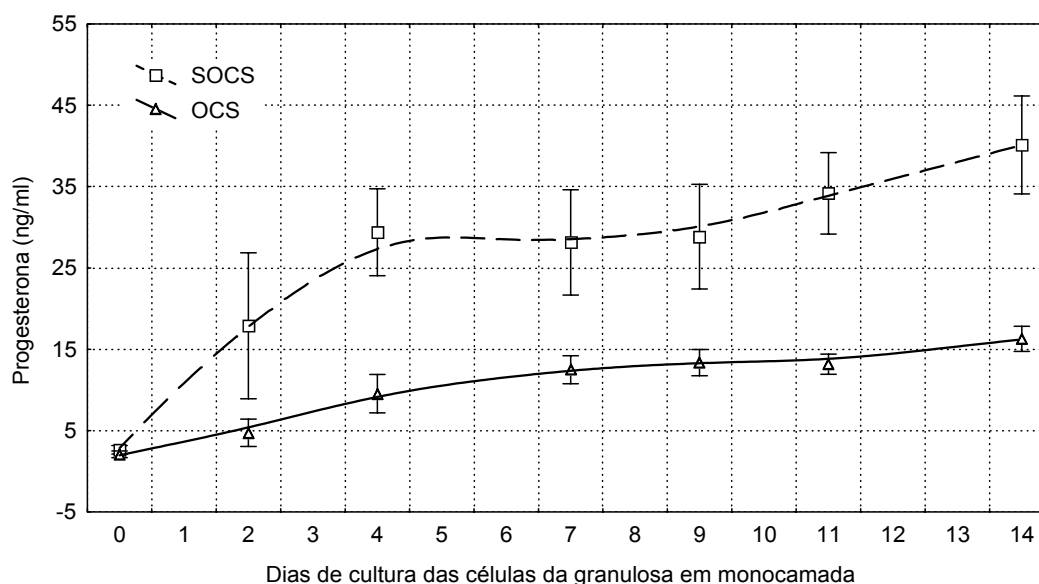
Em ambos os casos, o padrão de síntese da progesterona ao longo da cultura mostra um aumento acentuado e significativo entre o início da cultura e o 4º dia, e daí em diante um aumento menos acentuado (Figura 1).

Tabela 4. Diferença na produção de progesterona pelas células da granulosa em culturas suplementadas com soro proveniente de vaca em cio pós-superovulação (SOCS) ou em cio natural (OCS).

	Concentração média de progesterona (ng/ml) durante a cultura de células da granulosa (sem embriões).						
	D0 média±ep	D2 média±ep	D4 média±ep	D7 média±ep	D9 média±ep	D11 média±ep	D14 média±ep
SOCS (n=5)	2,7 ± 0,6 *	17,9 ± 9,0	29,4 ± 5,3	28,1 ± 6,5	28,9 ± 6,4	34,2 ± 5,0	40,1 ± 6,0
OCS (n=4)	2,1 ± 0,5	4,7 ± 1,9	9,6 ± 2,7	12,5 ± 1,9	13,4 ± 1,8	13,2 ± 1,4	16,3 ± 1,7
ANOVA: F=	0,55	1,63	9,34	4,32	4,30	13,12	11,63
P=	0,483	0,242	0,018	0,076	0,077	0,008	0,011

* n=4

Figura 1. Efeito da suplementação de soro de vaca em cio natural (OCS) ou em cio após superovulação (SOCS) na produção de progesterona pelas células da granulosa em monocamada (média ± ep).



Discussão

Trabalhos anteriores, apresentam resultados aparentemente contraditórios quanto ao efeito do soro de vaca em cio superovulada sobre a produção de embriões (Matsuoka et al., 1992, Boediono et al., 1994, Gliedt et al, 1996). Para alguns autores, a adição de SOCS somente ao meio de maturação de oócitos repercute-se numa menor produção de embriões (Gliedt et al, 1996). Estes autores relacionam este efeito a um aumento do teor em estrogénios presente neste soro, o que é confirmado por Fukui (1989). Os trabalhos referidos vão no sentido de que o efeito negativo dos estrogénios durante a maturação do oócito sobre a produção de blastocitos é dose-dependente, tendo no entanto sido referidas concentrações inibidoras tão baixas como 1 ug/ml (Gliedt et al, 1996) e tão altas como 10 ug/ml (Fukui, 1989) no meio de cultura. Estas diferenças

devem-se provavelmente aos diferentes meios e sistemas de cultura utilizados. O conteúdo em estradiol no soro de vacas em cio superestimuladas varia de acordo com a distância ao pico de LH e com o número de folículos presentes (Callesen et al., 1990), sendo máximas no dia do cio coincidente com o pico de LH e decrescendo daí em diante. Em vacas superovuladas, Hyttel et al. (1991) verificaram existir uma relação negativa entre a concentração de estradiol intrafolicular e o grau de maturação do oócito encontrado, sendo a mesma relação positiva tratando-se da progesterona. Estes pressupostos indicam que soros de vacas em cio recolhidos no dia do cio apresentam concentrações de estradiol máximas e que estas serão ainda superiores tratando-se de vacas superovuladas. No nosso trabalho, a utilização de OCS e SOCS recolhidos 1 dia depois do início do cio não interferiu com o grau de maturação dos oócitos nem com a taxa de embriões produzidos, pelo que os níveis acrescidos de estradiol eventualmente presentes no SOCS não atingiram um limiar comprometedor. Contudo, não observámos uma melhoria na produção de embriões, como foi o caso de Matsuoka et al. (1992) comparando os dois soros referidos.

As concentrações de FSH e LH no momento em que os soros OCS e SOCS foram colhidos, estariam já num período de declínio como pudémos confirmar relativamente à LH doseada por ELISA nos lotes utilizados. A concentração de LH observada foi idêntica em ambos os soros, o que se reflecte na ausência de efeitos diferenciados sobre a maturação do oócito. O efeito do SOCS na produção acrescida de progesterona pelas células da granulosa que esteve provavelmente associado ao aumento da velocidade de crescimento e da qualidade dos embriões, não tendo por base níveis superiores de LH, poderá ser justificado pela presença de outros factores luteotróficos e estimulantes do crescimento celular como por exemplo as prostaglandinas, os IGFs, o EGF e outros. Relativamente às prostaglandinas, que são responsáveis pelo mecanismo da ovulação (Murdoch et al., 1986), sabe-se que a PGE2 e a PGI2 estão implicadas no fenómeno de luteinização (Alila et al., 1988). Por outro lado, a PGE2 favorece não só o a maturação do oócito nos bovinos (Marques et al., 1997) como foi implicada no processo de clivagem (Gurevich et al., 1993), crescimento e qualidade de embriões bovinos até ao 6º dia (Fortier et al., 1994, Nadeau et al., 1994) e na extrusão dos blastocitos em ovinos (Sayre e Lewis, 1993).

Conclui-se que o SOCS, em sistemas de co-cultura de embriões *in vitro* com células da granulosa, aumenta a velocidade de crescimento e melhora significativamente a qualidade de embriões transferíveis, processo que parece ser mediado por substâncias tróficas e luteotróficas presentes no soro com estas características.

Bibliografia

- Alila, H.W., Corradino, R.A., Hansel, W. (1988). A comparison of the effects of cyclooxygenase prostanoids on progesterone production by small and large bovine luteal cells. *Prostaglandins*, 36: 259-270.
- Bavister, B.D., Rose-Hellekant, T.A., Pinyopummintr, T. (1992). Development of *in vitro* matured / *in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined media. *Theriogenology*, 37: 127-146.
- Boediono, A., Takagi, M., Saha, S., Suzuki, T. (1994). Influence of day-0 and day-7 superovulated cow serum during development of bovine oocytes *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.*, 6: 261-264.

- Callesen, H., Greve, T., Hyttel, P., Bak, A., Gotfredsen, P., Holm, P. (1990). Preovulatory plasma estradiol-17 β concentrations and ovulation rates in PMSG/anti-PMSG treated heifers. *Theriogenology*, 34: 251-258.
- Cavaco Gonçalves, S., Marques, C.C., Stockemann, K., Wang, W., Horta, A.E.M. (1997). Influence of an antiprogestin (onapristone) on in vivo and in vitro fertilization. *Anim. Reprod. Sci.*, in press.
- Fortier, M.A., Nadeau, Y., Blouin, L. (1994). Cultured endometrial cells as a detection system for quantitative evaluation of bovine embryo quality. *Theriogenology*, 41: 196.
- Fukui, Y. (1989). Effects of sera and steroid hormones on development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro and co-cultured with bovine oviduct epithelial cells. *J. Anim. Sci.*, 67: 1318-1323.
- Gliedt, D.W., Rosenkrans, C.F., Rorie, R.W., Munyon, A.L., Pierson, J.N., Miller, G.F., Rakes, J.M. (1996). Effects of media, serum, oviductal cells, and hormones during maturation on bovine embryo development in vitro. *J. Dairy Sci.*, 79: 536-542.
- Gordon, I. (1994). *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Ed. Ian Gordon, Biotechnology in Agriculture Nº 11, CABI, Cambridge.
- Gurevich, M., Harel-Markowitz, E., Marcus, S., Shore, L.S., Shemesh, M. (1993). Prostaglandin production by the oocyte cumulus complex around the time of fertilization and the effect of prostaglandin E on the development of early bovine embryo. *Reprod. Fertil. Dev.*, 5: 281-283.
- Hyttel, P., Callesen, H., Greve, T., Schmidt, M. (1991). Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. *Theriogenology*, 35: 91-108.
- Marques, C.C., Pereira, R.M., Vasques, M.I., Baptista, M.C., Horta, A.E.M. (1997). Efeito das prostaglandinas sobre a maturação in vitro de oócitos bovinos. 1º Congresso Ibérico de Reprodução Animal, 3-6 de Julho, Estoril.
- Matsuoka, K., Sakata, S., Ichino, K., ShiMaya, Y., Suzuki, T. (1992). Effect of superovulated cow serum for culture of bovine oocytes to the blastocyst stage. *Theriogenology*, 37: 254.
- Murdoch, W.J., Peterson, T.A., Van Kirk, E.A., Vincent, D.L., Inskeep, E.K. (1986). Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. *Biol. Reprod.*, 35: 1187-1194.
- Nadeau, Y., Sirard, M.A., Lacouline, L., Fortier, M.A. (1994). Prostaglandins production as indicator of bovine embryo quality at the early blastocyst stage. *Theriogenology*, 41: 263.
- Sayre, B.L., Lewis, G.S. (1993). Arachidonic acid metabolism during early development of ovine embryos: a possible relationship to shedding of zona pellucida. *Prostaglandins*, 45: 557-569.
- StatSoft Inc., (1995). *STATISTICA for Windows (computer program manual)*. Tulsa, OK.
- Vasques, M.I., 1990. Relatório de Actividades - Adenda. Relatório apresentado ao Instituto Nacional de Investigação Agrária-Estação Zootécnica Nacional, Vale de Santarém.
- Vasques, M.I., Marques, C.C., Pereira, R.M., Baptista, M.C., Horta, A.E.M. (1997). Efeito luteotrófico de embriões bovinos e de diferentes tipos de soros sobre células da granulosa cultivadas in vitro. 1º Congresso Ibérico de Reprodução Animal, 3-6 de Julho, Estoril.