

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MEIOS NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS SUÍNOS

**SANTOS, Elisa Caroline da Silva^{1,2}; GONÇALVES, Alexander de Oliveira¹;
CASTRO, Natália Ávila¹; PEGORARO, Ligia Margareth Cantarelli³;
SCHIAVON, Raquel Schiavon¹; LUCIA JR, Tomaz¹**

*1*Laboratório de Reprodução Animal- Faculdade de Veterinária – UFPel

2 Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia- PPGB

3 Embrapa Terras Baixas

Campus Universitário s/n – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900

Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS.

elisa_css@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A maturação *in vitro* (MIV) é um dos passos mais importantes para que a Produção *in vitro* (PIV) de embriões suínos ocorra de modo eficiente. Durante a MIV os oócitos sofrem alterações nucleares, bioquímicas, moleculares e citoesqueléticas, importantes para o início do desenvolvimento embrionário. Durante a maturação citoplasmática o oócito sofre modificações em seu citoplasma essenciais para a sua ativação, formação de pronúcleos e desenvolvimento pré-implantação, enquanto que na maturação nuclear o oócito readquire a capacidade de finalizar a meiose (PTAK *et al.*, 1999).

Oócitos suínos maturados *in vitro* ainda apresentam seu desenvolvimento comprometido quando comparados com oócitos maturados *in vivo*. Estudos relatam que *in vitro* os níveis de fatores secretados pelos oócitos ainda são inapropriados (GILCHRIST *et al.*, 2008). Estes fatores agem nas células foliculares e regulam diversas funções, sendo que uma delas é a expansão das células cumulus (GOMEZ *et al.*, 2011).

Neste contexto, ainda não existe um meio padrão para a MIV suína. Dentre os meios que já foram desenvolvidos estão o *North Carolina State University*, NCSU- 23 e NCSU-37, sendo que, este último apresenta como diferença a adição o fluido folicular suíno (PFF) (PETTERS & WELLS, 1993;SUZUKI *et al.*, 2006). Já outros grupos de pesquisa utilizam o TCM-199 como meio base (HULINSKA *et al.*, 2011; KAMIYA *et al.*, 2006). Outro meio desenvolvido é o PZM (*Porcine zygote medium*), o qual foi inicialmente desenvolvido para cultivo embrionário, sendo que sua constituição baseou-se em fluido do oviduto suíno (YOSHIOKA *et al.*, 2002). Posteriormente, este meio foi modificado para que pudesse ser utilizado na MIV, sendo denominado por YOSHIOKA *et al.*, 2003 de PGM, (*Porcine gamete medium*). Sendo que o PZM-4 é uma modificação do PZM inicial, o qual utiliza polynivil alcohol (PVA) como constituinte do meio (YOSHIOKA *et al.*, 2002).

Atualmente têm se buscado o desenvolvimento de meios com novos aditivos, que possam promover uma maior taxa de maturação, nuclear e citoplasmática. Dentre eles, o EGF (fator de crescimento epidermal) quando adicionado em meios de MIV agiu como promotor de atividade meiótica e aumentou as taxas de maturação nuclear (UHM *et al.*, 1998, UHM *et al.*, 2010). Já o dibutilil AMPc têm sido correlacionado com a sincronização entre a maturação nuclear e a citoplasmática (SUGIMURA *et al.*, 2010). O inositol induz a liberação de Ca⁺, importante para a fertilização. No entanto, foi observado que a liberação de Ca⁺ coincide com oócitos que apresentam o citoplasma maturo. Por isso o

inositol pode ser uma importante via para a maturação citoplasmática (AMANO *et al.*, 2005).

Este trabalho teve como objetivo a elaboração de um protocolo eficiente para a maturação *in vitro* de oócitos suínos. Para isso, foram testados na MIV suína os meios TCM-199m e o PZM-4m.

2. METODOLOGIA

Nesta pesquisa foram utilizados ovários de fêmeas suínas procedentes de abatedouro. Estes foram conduzidos ao laboratório na temperatura de 30°C em solução salina 0,9%, acrescida de gentamicina. A punção dos complexos cumulus oophorus (COC`s) foi realizada a partir de folículos entre 3-6 mm, através de agulha 21 G. Os COC`s foram lavados 3 vezes em meio de lavagem contendo hepes (NaCl 100 mM, KCl 10 mM, frutose 0,5 mM, mio inositol 2,77 mM, NaHCO₃ 5mM, hepes 25 mM, glicina 10 mM, tri sódio citrato 0,34 mM, KH₂PO₄ 0,35 mM, MgSO₄ 0,4 mM, NaCl₂ 2H₂O 1,71 mM, phenol red 4 µM, 0,00005 g/ml, lactato de sódio xarope 60% 5,35 mM, ácido pirúvico 0,2 mM, EDTA 0,01 mM). Após este procedimento foram classificados morfologicamente. Somente COC`s grau 1, foram utilizados neste experimento. Após a classificação os COC`s foram separados em dois meios de MIV: TCM-199m e PZM-4m adicionado de Frutose 0,5 mM, Glucose 4,0 mM, Mio Inositol 2,77 mM, Glicina 10 mM, Cisteína 0,24 mM, -Mercaptoetanol 25 µM, Tri Sódio Citrato 0,34 mM, Phenol red 4 µM, Lactato de Sódio xarope 60% 10 mM, EDTA 0,01 mM.

Foram utilizados 289 COC`s, sendo 128 no meio PZM-4m e 161 no meio TCM 199-m. Em ambos os meios de MIV foi utilizada a proporção de 40 COC`s por gota de 400 µl. Nas primeiras 24 h a MIV foi conduzida nos dois meios de MIV, ambos contendo como aditivos: EGF (10 ng/ml), LH (5 µg/ml), FSH (5 µg/ml), AMP-c (0,1 mM) e fluido folicular suíno (10%). Decorrido esse período permaneceram por mais 24h, no mesmo meio, porém, sem hormônios e sem AMP-c. Após 48 h os oócitos foram desnudados através de pipetagem para avaliação da maturação *in vitro*. A maturação nuclear foi avaliada com Hoeschst (Sigma® H33342), através de microscopia de epifluorescência segundo UHM *et al.*, 2007. Foram classificados como maduros os oócitos em metáfase II (MII). Os dados foram comparados pelo teste qui-quadrado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta pesquisa foram analisados 289 oócitos, dentre estes 87 (30 %) foram considerados maduros. A taxa de MII foi de 38,53 % no meio PZM-4m e de 48,47 % no meio TCM-199m, não existindo diferença estatística dentre eles (tabela 1).

Tabela 01. Taxa de maturação de Oócitos suínos em dois diferentes meios

Tratamento	Imaturos (%)	Maduros n (%)
PZM4-m	83 (89,5%)	45(38,5%) ^a
TCM-199m	119 (112,5%)	42(48,5%) ^a

(P>0,05)

Este resultado demonstrou que ambos os meios podem ser utilizados na MIV suína, sem diferença. MARQUES *et al.*, (2007), relataram que a maturação nuclear pode ocorrer utilizando-se diversos meios. Entretanto, para que a fecundação *in vitro* ocorra adequadamente, não somente a maturação nuclear é necessária, é importante que a maturação citoplasmática também tenha ocorrido de forma eficiente. Com a intenção de obter melhores taxas de maturação, nuclear e citoplasmática, vários meios têm sido estabelecidos por diversos grupos de pesquisa.

Neste contexto, ainda não existe um meio totalmente estabelecido para a MIV de oócitos suínos. Vários aditivos estão sendo testados, o que torna a composição dos meios ainda muito variável. YOSHIOKA *et al.*, (2008) compararam o NCSU-37, com o meio PZM modificado para a maturação, fecundação e cultivo. Estes autores alcançaram as mesmas taxas de maturação com meio PZM e meio NCSU-37, o que evidencia que o PZM pode ser utilizado na MIV.

O presente trabalho obteve resultados equiparados entre PZM-4m e TCM-199. Entretanto, os meios testados não apresentaram eficiência na MIV, pois as taxas foram mantidas em torno de 38%. O meio TCM já foi utilizado por diversos autores, na maturação de oócitos suínos, sendo que MARQUES *et al.*, 2007 considerou este meio mais estável que o NCSU-23. Entretanto, ambos os meios PZM4-m e TCM-199 não haviam sido testados com os mesmos aditivos.

4. CONCLUSÃO

Ambos os meios PigPel e TCM-199m demonstraram índices insuficientes de maturação. É necessário a continuação de ações experimentais para determinação de um meio que proporcione índices satisfatórios para a implementação do sistema de produção *in vitro* de embriões suínos.

5. REFERÊNCIAS

EPPIG , J. J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. **Reprod. Fertil Dev**, v. 8, p. 485 – 489, 1996.

HULINSKA, P.; MARTECIKOVA, S.; JESETA, M.; MACHATKOVA, M. Efficiency of *in vitro* fertilization is influenced by the meiotic competence of porcine oocytes and time their maturation. **Animal Reproduction Science** v. 124, p. 112- 117, 2011.

KAMIYA, C.; KOBAYASHI, M.; FUKUI, Y. *In vitro* culture conditions using chemically defined media for *in vitro* matured and intracytoplasmically inseminated porcine oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n.5, 2006.

MARCO-JIMENÉZ, F.; LLOBAT, L.; VICENTE, J.S. Effects of lanosterol on *in vitro* maturation of porcine oocytes. **Animal Reproduction Science** v. 117, p. 288 - 294, 2010.

MARQUES, M. G.; NICACIO, A. C.; OLIVEIRA, V. P.; NASCIMENTO, A. B.; CAETANO, H. V. A.; MENDES, C. M.; MELLO, M. R. B.; MILAZZOTTO, M. P.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D; VISINTIN, J. A. *In vitro* maturation of pig oocytes with

different media, hormone, and meiosis inhibitors. **Animal Reproduction Science** v. 97, p. 375-381, 2007.

PAWLAK, P.; PERS-KAMCZYC, E.; RENSKA, N.; KUBICKOVA, S.; LECHNIAK, D. Disturbances of nuclear maturation in BCB positive oocytes collected from peri pubertal gilts. **Theriogenology**, v. 75, p. 832-840, 2011.

PETERS, R. M. & WELLS, K. D. Culture of pig embryos. **J Reprod Fertil Suppl** v. 48, p. 61-73, 1993.

PTAK, G.; LOI, P.; DATTENA, M.; TISCHENER, M.; CAPPAL, P. Offspring from one-month-old lambs: studies on the developmental capability of pre-pubertal oocytes. **Biol. Reprod.** v, 61, p. 1568 – 1574, 1999.

SUGIMURA, S.; YAMANAKA, K-I; KAWAHARA, M.; WAKAI, T.; YOKOO, M.; SATO, E. Early metaphase II oocytes treated with dibutyl cyclic adenosine monophosphate provide suitable recipient cytoplasm for the production of miniature of pig somatic cell nuclear transfer embryos. **Animal Science Journal**, v. 81, p. 48-57, 2010.

SUZUKI, M.; MISUMI, K.; OSAWA, M.; NOGUCHI, J.; KANEKO, H.; OHNUMA, K.; FUCHIMOTO, D. I.; ONISHI, A.; IWAMOTO, M.; SAITO, N.; NAGAI, T.; KIKUCHI, K. Successful piglet production by IVF of oocytes matured in vitro using NCSU-37 supplemented with fetal bovine serum. **Theriogenology**, v. 65, p. 374-386, 2006.

UHM S. J.; CHUNG, H. M.; SEUNG K. R.; KIM, N. H.; LEE, H. T.; CHUNG, K. S. Interactive affects of epidermal growth factor, transforming growth factor beta and gonodotropin on in vitro maturation of porcine oocytes. **Theriogenology**.v. 49, p. 319, 1998.

UNHM S. J.;GUPTA, M. K.; KIM, T. LEE, H. T. Expression of enhanced green fluorescent protein in porcine- and bovine-cloned embryos following interspecies somatic cell nuclear transfer of fibroblasts transfected by retrovirus vector. **Molecular Reproduction Development**, v. 74., p.1538–47, 2007.

UHM, S. J.; GUPTA, M. K.; YANG, J. H.; CHUNG, H. –J.; MIN, T. S.; LEE. H. T. Epidermal growth factor can be used in lieu of follicle-stimulating hormone for nuclear maturation of porcine oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, v. 73, p. 1024 - 1036, 2010.

YOSHIOKA, K.; SUZUKI, C.; TANAKA, A.; ANAS, M.-K. I., IWAMURA S. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. **Biology of Reproduction**, v. 66, p.112-119, 2002.

YOSHIOKA, K.; SUZUKI, C.; ONISHI, A. Defined system for in vitro Production of porcine embryos using a single basic medium. **Journal of Reproduction and Development**, v. 54, n. 3, 2008.