

Taxa de maturação de oócitos suínos em meio definido e suplementado com fluido folicular

BARBARA DA SILVA ALVES¹; CRISTINA SANGOI HAAS², VERÓNICA HOYOS MARULANDA², ARNALDO VIEIRA DINIZ², RAFAEL GIANELLA MONDADORI², THOMAZ LUCIA JUNIOR³

¹*Universidade Federal de Pelotas – bsilvaalves89@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – cristinasangoi@gmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas – tluciajr@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

Tanto a pesquisa básica de fisiologia reprodutiva, quanto o desenvolvimento de pesquisa biotecnológica envolvendo transgênese e clonagem exigem o estabelecimento de um sistema confiável de produção *in vitro* (PIV) de embriões suínos. O sistema de PIV envolve as etapas de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* (MIV, FIV e CIV, respectivamente) dos possíveis zigotos (TAMÁS, 2004).

A maturação *in vitro* é a etapa mais crucial para a PIV. Para que a maturação nuclear e citoplasmática *in vitro* ocorra é necessário um meio de maturação eficiente. Diversos fatores influenciam os meios de maturação *in vitro*, entre eles, a suplementação com fluido folicular e gonadotrofinas. A suplementação de meios de maturação é utilizada para possibilitar um ambiente artificial mais próximo do fisiológico.

No entanto, a utilização de fluido folicular envolve moléculas e componentes desconhecidos e que variam entre suas diversas fontes, afetando diretamente a maturação, bem como dificulta o estudo da adição de novos componentes ao meio de maturação. A utilização de fluido folicular suíno (FF) auxilia a retomada da meiose e aumenta as taxas de maturação (DUCOLOMB et al. 2013), além de proteger do estresse oxidativo (TATEMOTO et al. 2004). Visando a utilização de uma macromolécula para substituir as proteínas fornecidas pelo FF, tem sido utilizado o álcool polivinílico (PVA), que não é metabolizado pelo complexo cumulus-oócito (CCO). Assim sendo, o uso desse componente torna o meio quimicamente definido, sendo possível avaliar o efeito de outras moléculas usadas no meio de maturação. Assim como, utilizar FSH (Hormônio Folículo Estimulante) e LH (Hormônio Luteinizante) na primeira metade da MIV é importante para a maturação. Enquanto que oócitos *in vivo* permanecem no estágio de prófase, podemos encontrar que após a aplicação de LH em um meio de maturação *in vitro*, é possível o recomeço da meiose até a sua chegada em metáfase II (MII) (MATTIOLLI et al. 1991). Também é possível verificar que a adição de FSH estimula a retomada da meiose e é possível chegada em MII, dependendo da dose utilizada (BING et al. 2001).

O objetivo do trabalho foi avaliar as taxas de maturação *in vitro* utilizando um meio quimicamente definido, assim como o uso de meio de maturação suplementado com fluido folicular suíno.

2. METODOLOGIA

Ovários de fêmeas suínas pré-púberes foram coletados em frigorífico local e transportados em NaCl 0,9 % a temperatura de 30-35 °C. No laboratório, os CCOs foram recuperados a partir de folículos entre 3-6 mm de diâmetro. Somente os óócitos com citoplasma homogêneo e com células do cumulus compactas foram utilizados.

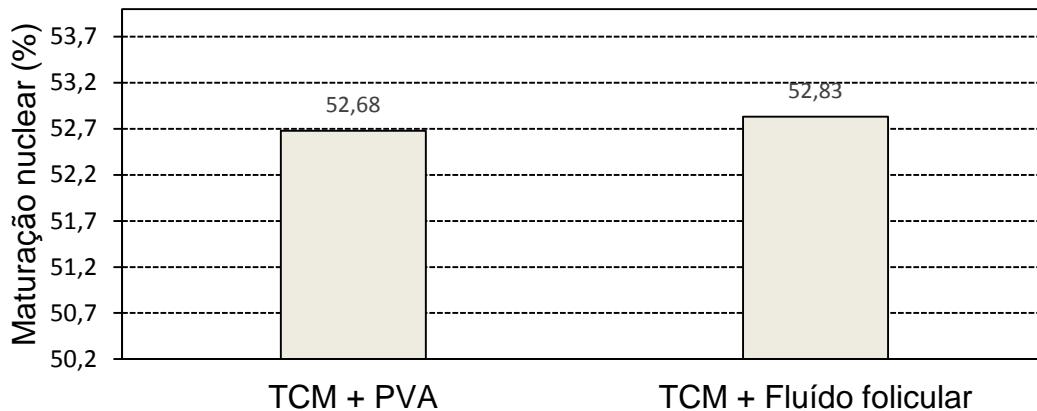
O meio de MIV foi constituído de TCM 199 suplementado com 0,57 mM de cisteína, 0,91 mM de piruvato de sódio, 10 ng/mL de EGF, 10 UI/mL de FSH, 10UI/mL de LH e 0,1% de PVA (JIA et al. 2014 e CASILLAS et al. 2014). Ao redor de 30 óócitos foram maturados em cada poço de uma placa de quatro poços contendo 400 µL de meio de MIV e incubados por 44hs (22hs na presença de gonadotrofinas e 22h sem as gonadotrofinas), a 38,5°C em 5% de CO₂ em ar com umidade saturada.

Para determinação dos grupos, foi utilizado o grupo 1 com TCM-199 e grupo 2 com TCM-199 suplementado com FF. Para avaliar a taxa de maturação nuclear dos óócitos submetidos aos tratamentos, foi realizada uma análise estatística com Test t e significância de p ≤ 0,05.

Após o término do período de MIV a taxa de maturação nuclear foi determinada nos diferentes grupos através de microscopia de epifluorescência, utilizando 30 µg/mL de Hoechst (Sigma® H33342), segundo UHM et al. (2007). Foram classificados conforme a disposição do material genético e contabilizados o número de estruturas que atingiram a fase de metáfase II (MII).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de maturação nuclear (gráfico) encontrada no grupo 1 foi de 52,68% e no grupo 2 foi de 52,83%, não havendo diferença estatística significativa. No entanto, CASILLAS et al. (2014) e SOMFAI et al. (2014) encontraram, respectivamente, uma taxa de MIV de 70% e 66,8%, usando um meio quimicamente definido. Já em relação a taxa de MIV adicionando um meio de maturação suplementado com fluido folicular, TATEMOTO et al. (2004) e YOON et al. (2015) encontraram taxas de 77,8% e 81,5%, respectivamente.



4. CONCLUSÕES

Tendo em vista as baixas taxas de maturação encontradas em ambos grupos neste trabalho, é necessário aumentar o número de óocitos utilizados em MIV e padronização da técnica para obtenção de um sistema de maturação eficiente, porém é importante observar que não foi observada diferença estatística entre os grupos com e sem FF.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

TAMÁS, S. **Synchronization of in vitro maturation of porcine oocytes**. 2004. Dissertação (Ph.D. School for the Biological, Technological, Ecological, Feeding and Economical Questions of Animal Production) – Curso de Agriculture and Food Sciences, University of West-Hungary.

DUCOLOMB, Y.; GONZÁLEZ-MÁRQUEZ, H.; FIERRO, R.; JIMÉNEZ, I.; CASAS, E.; FLORES, D.; SALAZAR, E. B. Z.; BETANCOURT, M. Effect of porcine follicular fluid proteins and peptides on oocyte maturation and their subsequent effect on in vitro fertilization. **Theriogenology**, México, v. 79, p. 896-904, 2013.

TATEMOTO, H.; MUTO, N.; SUNAGAWA, I.; SHINJO, A.; NAKADA, T. Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during in vitro maturation: Role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. **Biology of Reproduction**, Japão, v. 71, p. 1150-1157, 2004.

MATTIOLI, M.; BACCI, M. L.; GALEATI, G.; SEREN, E. Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocytes in vitro. **Theriogenology**, Itália, v. 36 (1), p. 95-105, 1991.

BING, Y. Z.; NAGAI, T.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effects of cysteamine, FSH and estradiol-17 β on in vitro maturation of porcine oocytes. **Theriogenology**, Japão, v. 55, p. 867-876, 2001.

JIA, B.; WU, G.; FU, X.; MO, X.; DU, M.; HOU, Y.; ZHU, S. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid enhances in vitro maturation of porcine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, China, v. 81, p. 20-30, 2014.

CASILLAS, F.; TETELTITLA-SILVESTRE, M.; DUCOLOMB, Y.; LEMUS, A. E.; SALAZAR, Z.; CASAS, E.; BETANCOURT, M. Co-culture with granulosa cells improve the in vitro maturation ability of porcine immature oocytes vitrified with cryolock. **Cryobiology**, México, v. 69, p. 299-304, 2014.

UHM, S. J.; GUPTA, M. K.; KIM, T.; LEE, H. T. Expression of enhanced green fluorescente protein in porcine and bovine cloned embryos following interspecies somatic cell nuclear transfer of fibroblasts transfected by retrovirus vector. **Molecular Reproduction and Development**, Coreia do Sul, v. 74, p. 1538-1547, 2007.

SOMFAI, T.; YOSHIOKA, K.; TANIHARA, F.; KANEKO, H.; NOGUCHI, J.; KASHIWAZAKI, N.; NAGAI, T.; KIKUCHI, K. Generation of live piglets from cryopreserved oocytes for the first time using a defined system for in vitro embryo production. **Plos One**, Japão, v. 9 (5), p. 1-9, 2014.

YOON, J. D.; JEON, Y.; CAI, L.; HWANG, S. U.; KIM, F.; LEE, E.; KIM, D. Y.; HYUN, S. H. Effects of co-culture with cumulus-derived somatic cells on in vitro maturation of porcine oocytes. **Theriogenology**, Coreia, v. 83, p. 294-305, 2015.