

## FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS SUÍNOS SELECIONADOS ATRAVÉS DO *BRILLIANT CRESYL BLUE* (BCB) EM DIFERENTES MEIOS

ELISA CAROLINE DA SILVA SANTOS<sup>1,4</sup>  
BRUNA MION<sup>2,4</sup>; MIRIANE MENDES PEREIRA<sup>3</sup>; LIGIA MARGARETH  
CANTARELLI PEGORARO<sup>3</sup>; THOMAZ LUCIA JUNIOR<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Doutoranda PPGBiotec, Universidade Federal de Pelotas – [elisa\\_css@hotmail.com](mailto:elisa_css@hotmail.com)

<sup>2</sup>Graduanda em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas –  
[brunamion@veterinaria.med.br](mailto:brunamion@veterinaria.med.br)

<sup>3</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – [mirimendes@hotmail.com](mailto:mirimendes@hotmail.com);  
[ligia.pegoraro@embrapa.br](mailto:ligia.pegoraro@embrapa.br)

<sup>4</sup>ReproPEL, Faculdade de Veterinária – [Tomjr2004@yahoo.com.br](mailto:Tomjr2004@yahoo.com.br)

### 1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões suínos representa um grande aumento na eficiência de transmissão de melhoria de potencial genético (DOBRINSKY, 2001). Além disso, há um grande interesse na PIV dessa espécie para fins de investigação biomédica, devido à similaridade fisiológica com os seres humanos (ABEYDEERA, 2002).

Os resultados obtidos através da utilização dessa biotécnica são menos satisfatórios quando comparados com os resultados da PIV de embriões bovinos. Esses problemas são decorrentes de falhas durante o desenvolvimento do embrião, como maturação citoplasmática ineficiente, elevado grau de polispermia e baixas taxas de produção de blastocistos viáveis (NIEMANN & RATH, 2001). Grande parte dessas falhas é decorrente da seleção de oócitos com baixa qualidade (NARUSE *et al.*, 2006), que não apresentam características morfológicas, moleculares, bioquímicas, celulares e metabólicas adequadas para manter seu desenvolvimento (WALCZAK *et al.*, 2012).

O corante *Brilliant Cresyl Blue* (BCB) auxilia no processo de seleção dos oócitos que serão destinados a produção de embriões. O BCB é um corante vital (PUJOL *et al.*, 2004) que permite avaliar a atividade intracelular da G6PDH, enzima produzida durante o crescimento do oócito. Contudo, sua produção é cessada quando o gameta finaliza seu crescimento (WONGSRIKEAO *et al.*, 2006). O teste consiste na avaliação da capacidade da G6PDH em degradar o BCB (ALM *et al.*, 2005). Portanto, oócitos imaturos possuem altas concentrações da enzima, conseguindo converter o corante e mantendo-se incolores; enquanto que oócitos maduros possuem baixas concentrações da enzima, não convertendo o corante, permanecendo corados (MANJUNATHA *et al.*, 2007). O BCB tem sido utilizado por vários autores, os quais utilizaram para a coloração o meio D-PBS (ROCA *et al.*, 1998; WONGSRIKEAO *et al.*, 2006; OPIELA *et al.*, 2008; MOTA *et al.*, 2009; OPIELA *et al.*, 2010; PAWLAK *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2013).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a seleção de oócitos suínos através do BCB em diferentes meios, na maturação (MIV) e na fertilização *in vitro* (FIV).

### 2. METODOLOGIA

Ovários de fêmeas pré-púberes foram coletados em frigorífico local e transportados em NaCl 0,9 % acrescida de gentamicina em temperatura de 30-35 °C. No laboratório, os complexos cumulus oócitos (CCOs) foram recuperados a partir de folículos entre 3-6 mm de diâmetro, puncionados através de agulha 19 G acoplada à bomba de vácuo com pressão de 14 mmHg. Após a sedimentação os

oócitos foram selecionados em lupa estereoscópica. Somente os oócitos com citoplasma homogêneo e com células do cumulus compactas foram classificados. Após classificação, os CCOs foram separados em 5 grupos, os 2 primeiros com acréscimo do *Brilliant Cresyl Blue* (BCB) e os 3 últimos sem acréscimo (controles): 1) BCB+D-PBS ; 2) BCB+Repropel; 3) D-PBS; 4) ReproPel; 5) meio controle líquido folicular (PFF), no qual os oócitos não tiveram contato com nenhum meio além do PFF durante a busca e seleção. Em cada grupo, os CCOs permaneceram por 60 min, em placa fechada dentro de estufa de CO<sub>2</sub> sob a temperatura de 39 °C. Após este tempo foi feita a observação de coloração e os CCOs foram separados em corados e não corados.

Todos os CCOs foram colocados para maturação por 48h em meio NCSU-23 suplementado com 10% de líquido folicular suíno (PFF), piruvato (0,727 mM), hipotaurina (5 mM), cisteína (0,6 mM), EGF (10 ng/ml), glutamina (1,0 mM) e B-mercaptoetanol 25 µM. Sendo que somente nas primeiras 24 horas os meios foram acrescidos de 10 Ui de hCG e eCG e dAMP-c (1 mM).

A fecundação *in vitro* foi realizada utilizando meio mTBM (ABEYDEERA *et al.*, 1997). Foi utilizado sêmen congelado de um macho com fertilidade previamente conhecida em todo o experimento. A seleção espermática foi realizada através do método mini-percoll, sendo que o gradiente utilizado foi de 45% e 80%, ambos utilizaram o meio mTBM para diluição do percoll. A primeira rotação foi de 1.000 rcf por 2 min. O pellet foi ressuspensionado em meio de FIV e realizada a segunda rotação de 900 rcf durante 1 min. Após foi retirado o sobrenadante e realizada a concentração. Os oócitos foram inseminados em gotas de 400 µL com a proporção de 200.000 espermatozoides/gota, durante 6 h. Passado este período foi realizado o cultivo, em meio PZM3 acrescido de piruvato 0,2mM, glutamina 1mM, hipotaurina 5mM e BSA 3mg/mL até o D4. No D4 o meio foi trocado, foi utilizado a partir deste dia meio PZM3 com os mesmos aditivos anteriores, com exceção do BSA, este foi alterado por 10% soro fetal bovino inativado. Após a FIV foram avaliados a clivagem e o desenvolvimento embrionário.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de clivagem, avaliada no segundo dia após a FIV, e as porcentagens de mórula compacta e blastocisto, avaliados no sétimo dia após a FIV, estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1:** Porcentagem de oócitos clivados, desenvolvimento de mórula compactada e blastocistos nos diferentes meios utilizados.

| Método    | D2 % (n)   | MC+BL %(n)              | (n) total |
|-----------|------------|-------------------------|-----------|
| PBS+      | 44,8 (69)  | 10,4 (16) <sup>ab</sup> | 154       |
| PBS-      | 36,7 (29)  | 17,7 (14) <sup>a</sup>  | 79        |
| PBSc      | 47,7 (169) | 6,2 (22) <sup>b</sup>   | 354       |
| Repropel+ | 46,5 (114) | 7,8 (19) <sup>b</sup>   | 245       |
| Repropel- | 100 (26)   | 3,8 (1) <sup>c</sup>    | 26        |
| Repropelc | 46,3 (74)  | 10,6 (17) <sup>ab</sup> | 160       |
| (n) Total | 481        | 89                      | 1018      |

Os resultados deste trabalho mostraram que ambos os meios podem ser utilizados para a manutenção oocitária. Porém, para o teste de seleção BCB os

resultados obtidos foram contraditórios para ambos meios. Com a utilização do meio PBS, não houve diferença nos resultados entre os grupos positivo e negativo, o que demonstrou que nesse meio a seleção de oócitos com maior viabilidade não ocorreu eficientemente. Já no meio ReproPel, houve diferença entre o grupo positivo e o negativo, contudo o grupo controle não diferiu do grupo corado. Esse resultado demonstra que o meio ReproPel teve maior eficiência na seleção oocitária que o meio PBS. Entretanto, como não houve diferença do grupo corado com o controle, questiona-se a necessidade da utilização do BCB.

A seleção de oócitos competentes é crucial para a produção *in vitro* de embriões (FAKRUZZAMAN *et al.*, 2013). O BCB foi considerado um teste simples e eficaz para a seleção oocitária em várias espécies (ROCA *et al.*, 1998; WONGSRIKEAO *et al.*, 2006; OPIELA *et al.*, 2010). Entretanto, existem autores que acreditam que o BCB é um método duvidoso, devido aos oócitos corados, os quais são considerados mais viáveis, não diferirem do grupo controle, sem exposição ao corante (OPIELA *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2013). Também, PAWLAK *et al.*, (2011) encontraram altas taxas de alterações cromossomais em oócitos após exposição ao BCB.

A baixa taxa de desenvolvimento embrionário encontrada neste trabalho pode ter ocorrido em decorrência do período em que os oócitos ficaram em contato com o corante e com o meio durante o teste do BCB. Todos os oócitos fecundados foram expostos somente ao meio ou ao meio com corante por um tempo adicional de 60 min. Este período de exposição pode afetar o desenvolvimento (OPIELA & KATSKA-KSIAZKIEWICZ, 2013). GOOVAERTS *et al.* (2010) e VANDAELE (2008) relataram que o tempo para o teste BCB, geralmente entre 60 e 90 min pode acarretar em perda na viabilidade, comprometendo o desenvolvimento embrionário posterior.

#### 4. CONCLUSÕES

A manutenção dos oócitos suínos pode ser realizada através da utilização dos meios PBS e ReproPel. Entretanto, para a seleção através do BCB, é necessária a realização de outros estudos para confirmar a efetividade do meio ReproPel.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEYDEERA, L. R. In vitro production of embryos in swine. **Theriogenology**, USA, v.57, p. 257-273, 2002.
- ALM, H., TORNER, H., LOHRKE, B., VIERGUTZ, T., GHONEIM, I. M., KANITZ, W. Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Theriogenology**, Alemanha, v. 63, p. 2194-2205, 2005.
- DOBRINSKY, J. R. Cryopreservation of swine embryos: a chilly past with a vitrifying future. **Theriogenology**, USA, v.56, p. 1333-1344, 2001.
- GOOVAERTS, I. G. F.; LEROY, J. L.M. R.; JORSSSEN, E. P. A.; BOLS, P. E. J. 2010. Noninvasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte culture. **Theriogenology**, v. 74, p.1509-1520.
- KEMPISTY, B., JACKOWSKA, M., PIOTROWSKA, H., ANTOSIK, P., WOZNA, M., BUKOWSKA, D. Zona pellucida glycoprotein 3 (pZP3) and integrin b2 (ITGB2) mRNA and protein expression in porcine oocytes after single and double exposure to brilliant cresyl blue test. **Theriogenology**, Polônia, v. 75, p. 1525-1535, 2011.
- MANJUNATHA, B. M., GUPTA, P. S. P., DEVERAJ, M., RAVINDRA, J. P., NANDI, S. Selection os developmentally competent buffalo oocytes by brilliant

- cresyl blue staining before IVM. **Theriogenology**, Italia, v.68, p. 1299-1304., 2007.
- MOTA, G. B.; BATISTA, R. I. T. P.; SERAPIÃO, R. V.; CORTES, M. B.; VIANA, J. H. M.; TORRES, C. A. A. T.; CAMARGO, L. S. A. Developmental competence and expression of the MATER and ZART1 genes in immature bovine oocytes selected by brilliant cresyl blue. **Zygote**, v. 18, p. 209-216, 2009.
- NARUSE, K., KIM, H. R., SHIN, Y. M., CHANG, S. M., LEE, H. R., PARK, C. S., JIN, D. I. Low concentrations of MEM vitamins during in vitro maturation of porcine oocytes improves subsequent parthenogenetic development. **Theriogenology**, Coréia do Sul, v. 67, p. 407-412, 2006.
- NIEMANN, H., RATH, D. Progress in reproductive biotechnology in swine. **Theriogenology**, Germany, v. 56, p. 1291-1304, 2001.
- OPIELA, J.; KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; LIPINSKI, D.; SLOMSKI, R.; BZOWSKA, M.; RYNSKA, B. Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis related genes Bcl-2 and Bax, and developmental competence following IVP in cattle. **Theriogenology**, v. 69, p. 546-555, 2008.
- OPIELA, J.; LIPINSKI, D.; SLOMSKI, R.; KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L. Transcript expression of mitochondria related genes is correlated with bovine oocyte selection by BCB test. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p.118-193, 2010.
- OPIELA, J., KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L. The utility of Brilliant Cresyl Blue (BCB) staining of mammalian oocytes used for *in vitro* embryo production (IVP). **Reproductive Biology**, Polônia, v. 13, p. 177-183, 2013.
- PAWLAK, P.; PERS-KAMCZYC, E.; RENSKA, N.; KUBICKOVA, S.; LECHNIAK, D. Disturbances of nuclear maturation in BCB positive oocytes collected from peripubertal gilts. **Theriogenology**, v. 75, p.32-840, 2011.
- PEREIRA, G. R., LORENZO, P. L., CARNEIRO, G. F., BILODEAU-GOESELS, S., KASTELIC, J. P., ESTELLER-VICO, A., LOPEZ-BEJAR, M., LIU, I. K. Selection of developmentally competent immature equine oocytes with brilliant cresyl blue stain prior to in vitro maturation with equine growth hormone. **Zygote**, v.1, p.1-5, 2013.
- PUJOL, M., LÓPEZ-BÉJAR, M., PARAMIO, M.T. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. **Theriogenology**, Espanha, v. 61, p. 735-744, 2004.
- ROCA, J.; MARTINEZ, E.; VAZQUEZ, J. M.; LUCAS X. Selection of immature pig oocytes for homologous in vitro penetration assays with the brilliant cresyl blue test. **Reproduction Fertility Development**, v.10, p.479-85, 1998.
- UHM, 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.
- VANDAELE, L. 2008. Thesis, ISBN: 978-90-586-4150-2, chapter 5.2, p.109-23.
- WALCZAK, R., S'NIADK, P., DZIUBAN, J. A., KEMPISTY, B., JACKOWSKA, M., ANTOSIK, P., JASKOWSKI, J. M. Lab-on-a-chip spectrophotometric characterization of porcine oocytes. **Sensors and Actuators**, Polônia, v. 165, p. 38-43, 2012.
- WONGSRIKEAO, P., OTOI, T., YAMASAKI, H., AGUNG, B., TANIGUCHI, M., NAOI, H., SHIMIZU, R., NAGAI, T. Effects of single and double exposure to brilliant cresyl blue on the selection of porcine oocytes for in vitro production of embryos. **Theriogenology**, Japão, v. 66, p. 366-372, 2006.