

ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA DE OÓCITOS SUÍNOS OBTIDOS ATRAVÉS DE SLICING E ASPIRAÇÃO FOLICULAR UTILIZANDO DIFERENTES MEIOS PARA MANUTENÇÃO OOCITÁRIA.

MIRIANE MENDES PEREIRA¹; ELISA CAROLINE DA SILVA SANTOS^{2,3};
ELISANGELA MIRAPALHETA MADEIRA³; BRUNA MION³; LIGIA MARGARETH
CANTARELLI PEGORARO¹; THOMAZ LUCIA JUNIOR³

¹Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA – mirimendes@hotmail.com;
ligia.pegoraro@embrapa.br

²Doutoranda PPG Biotec, Universidade Federal de Pelotas – elisa_css@hotmail.com

³ReproPEL, Faculdade de Veterinária – elisangelamadeira@yahoo.com.br ;
brunamion@veterinaria.med.br; tomjr2004@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Os recentes progressos na PIV na espécie suína aumentaram a viabilidade embrionária e o número de embriões disponíveis para estudos do desenvolvimento embrionário pré-implantacional (TATEMOTO *et al.*, 2005). No entanto, em comparação com outras espécies domésticas, a eficiência em suínos permanece inferior devido a diversos fatores, como a limitações na MIV, que acarretam em anormalidades na fertilização (ABEYDEERA, 200). Esses fatores comprometem a produção de embriões, levando a variações nos índices de penetração espermática (50-90%), poliespermia (5-91%), clivagem (20-75%) e de blastocistos (2-36%) reduzindo a eficiência da FIV (NIEMANN & RATH 2001).

Neste sentido, é importante a seleção de complexos *cumulus*-oócitos (COCs) com boa capacidade de desenvolvimento, sendo a técnica de obtenção e meios utilizados para manutenção oocitária, fatores de grande consideração. Com relação aos meios para esta finalidade, o D-PBS têm sido amplamente utilizado para seleção oocitária (WONGSRIKEAO *et al.*, 2006) porém novos meios com composições mais elaboradas devem ser testados a fim de manter o estado de competência do oócito, pois a qualidade oocitária é um dos fatores determinantes para o sucesso da PIV (LEE *et al.* 2013). Neste contexto, o meio ReproPel foi formulado a partir do *Porcine Zygote Medium* (YOSHIOKA *et al.*, 2002), com modificações.

A obtenção dos COCs pode ser realizada através das técnicas: fatiamento dos ovários (*slicing*) ou a aspiração folicular com agulha acoplada à seringa ou bomba a vácuo (BERNARDI, 2005). De acordo com WANI *et al.* (2000), o *slicing* possibilita o acesso a folículos profundos no córtex ovariano, resultando em maior quantidade de COCs. No entanto, o *slicing* apresenta a desvantagem de ser uma técnica demorada, além de gerar muitos debris celulares que dificultam a posterior identificação dos COCs (WANI, 2002). Já a aspiração folicular, é considerada um método mais simples e rápido (WANI *et al.*, 2000). Porém, a quantidade e a qualidade dos COCs recuperados por meio da aspiração folicular dependem, entretanto, dos aspectos físicos envolvidos em tal técnica.

A ativação partenogenética é uma forma de averiguar a qualidade oocitária, através do desenvolvimento embrionário. Esta pode ser realizada através de tratamentos promovam o aumento da concentração intracelular de cálcio livre, através de liberação das reservas citoplasmáticas desse componente. Como por

exemplo, a ionomicina (LOI *et al.*, 1998) e o 6-DMAP (6- dimetilaminopurina) proteína inibidora da serina, a qual a aumentou o estímulo, acelerando a formação e o desenvolvimento pronuclear em oócitos de camundongos e bovinos (MOSES *et al.*, 1995). Ionomicina sequencialmente combinado com 6-DMAP têm sido amplamente utilizados para ativação oocitária (Ongeri *et al.*, 2001).

O objetivo deste estudo foi comparar através da ativação partenogenética dois meios de manutenção oocitária: D-PBS e ReproPel, assim como, diferentes técnicas de obtenção de oócitos: slicing e aspiração folicular.

2. METODOLOGIA

Os ovários foram coletados em frigorífico e transportados em NaCl 0,9 % em temperatura de 30-35 °C. A aspiração folicular foi conduzida a partir de folículos entre 3-6 mm de diâmetro, utilizando bomba de vácuo com 14 mmHg. No slicing, os ovários foram colocados em placa com meio D-PBS, sendo realizada incisão nos folículos entre 2-6 mm com lâmina de gilete. O meio contendo o fluido folicular e material celular foi filtrado e depositado em um Becker. Após 10 min, o sedimento foi ressuspensionado em D-PBS e colocado em banho-maria para nova sedimentação em tubos falcon de 50 mL. Após isso, os oócitos foram selecionados, somente os oócitos com citoplasma homogêneo e com células do cumulus compactas foram classificados, em ambos os métodos. Após seleção, os oócitos foram mantidos nos meios D-PBS e ReproPel, durante 60 min, dentro de estufa de CO₂.

A maturação foi realizada durante 48h em meio NCSU-23 segundo SANTOS *et al.* (2012). Após a MIV, as células do *cumulus* foram removidas através de pipetagem em meio TCM 199 contendo Hepes suplementado com 0,1% de hialuronidase. Os oócitos foram ativados utilizando ionomicina (20 µM/mL) por 5 min e 6-DMAP (2 mM/mL) por 3h. Finalizada a ativação, os oócitos foram colocados em meio de cultivo, PZM-3 (YOSHIOKA *et al.*, 2002) para o desenvolvimento embrionário, acrescido de piruvato (0,2 mM), glutamina (1mM), hipotaurina (5mM) e BSA (3mg/mL). No quarto dia acrescentou-se 10% de soro fetal bovino inativado. Os embriões foram avaliados quanto à clivagem no segundo dia e quanto ao desenvolvimento em mórula e blastocistos no sétimo dia.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1. D-PBS e ReproPel como meios para manutenção de oócitos suínos obtidos através de slicing e aspiração folicular e ativados partenogeneticamente.

Método	Aspiração		Slicing	
	MC +BI % (n)	n	MC+BI % (n)	n
D-PBS	6,0 (6) ^{bB}	93	19,1 (40) ^{aA}	169
ReproPel	12,9 (16) ^{aB}	108	21,9 (54) ^{aA}	193
(n) Total	31	470	143	961

*Letras minúsculas demonstram diferença estatística (P<0,05) em cada coluna e letras maiúsculas demonstram diferença estatística (P<0,05) em cada linha.

Os resultados deste trabalho indicaram que com relação ao meio para a manipulação oocitária, o ReproPel apresentou melhores resultados de desenvolvimento embrionário que o D-PBS, apenas no método de aspiração. No *slicing*, não ocorreu diferença entre os meios testados. Este resultado ocorreu, possivelmente, devido à metodologia necessária na técnica do *slicing*, através da qual os oócitos foram mantidos durante pelo menos 20 min em meio D-PBS.

A busca por meios que possibilitem melhores condições para a manutenção da viabilidade oocitária é importante para a melhora dos resultados da PIV em suínos. Segundo KRISHER et al., (2007) e Kikuchi et al., (2002), a necessidade de melhorar o processo de seleção e condições dos meios para oócitos e embriões, em suínos, existe com a finalidade de ajustá-los ao metabolismo do oócito desta espécie, o qual apresenta particularidades específicas (KRISHER et al., 2007).

Além de buscar aprimorar o meio para manter a viabilidade do oócito suíno, este trabalho também procurou evidenciar qual técnica de obtenção oocitária possibilitaria maior número de oócitos com qualidade. Neste sentido, com relação à técnica de obtenção oocitária, encontrou-se que através do *slicing* foi possível manter a qualidade e competência dos oócitos, de melhor forma que através da aspiração. Pois, o índice de desenvolvimento embrionário foi maior através do método *slicing* que o obtido na aspiração folicular (tabela 1).

Através de observações realizadas nesta pesquisa, através do *slicing* foi possível obter oócitos com número maior de camadas de *cumulus*, quando comparado com a aspiração. Isto evidencia que a aspiração, conforme foi utilizada nesta pesquisa, com bomba de vácuo e 14 mmHg de pressão, possivelmente, ocasionou modificações nos COCs. DAS et al. (1996), em estudo com oócitos de búfalos, também obteve mais oócitos com qualidade através do *slicing* que com a aspiração. Com relação ao número de camadas de células do *cumulus*, SHIRAZY et al., (2005) relataram que em oócitos ovinos, através do método de aspiração, foram encontrados maior número de oócitos parcialmente desnudos ou completamente desnudos, evidenciando que a pressão do vácuo causada pela aspiração foi responsável, nesta espécie, pela retirada destas células.

4. CONCLUSÕES

Através desta pesquisa conclui-se que o meio ReproPel pode ser uma alternativa para a manutenção de oócitos suínos e através do *slicing* obteve-se oócitos com maior qualidade que na aspiração.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEYDEERA L.R. In vitro production of embryos in swine. **Theriogenology** 57, 256–273, 2002.

BERNARDI M.L. Produção *in vitro* de embriões ovinos. **Acta Sci Vet**, v.33, p.1-16, 2005.

DAS, G. K.; JAIN. G.C.; SOLANKI, V.S.; TRIPATHI, V. N.; Efficacy of various collection methods for oocyte retrieval in buffalo. **Theriogenology**, v. 46, p. 1403-1411, 1996.

LEE, J.; YOU, J.; LEE, G-S.; HEJUN, S-H.; LEE, E. Pig oocytes with a large perivitelline space matured in vitro show greater developmental competence after parthenogenesis and somatic cell nuclear transfer. **Molecular Reproduction and Development**, Article in Press, DOI: 10.1002/mrd.22205, 2013.

LOI P.; LEDDA S.; FULKA J.; JR.; CAPPAL P.; MOOR R.M.; Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: Effect of activation protocols. **Biol Reprod** 58:1177–1187, 1998.

MOSES R.M; KLINE D.; MASUI Y. Maintenance of metaphase in colcemid-treated mouse eggs by distinct calcium and 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) sensitive mechanisms. **Dev Biol** 167:329–337, 1995.

NIEMANN, H.; RATH, D. Progress in reproductive biotechnology in swine. **Theriogenology**, v. 56, p. 1291-1304, 2001.

ONGERI E.M; BORMANN C.L; BUTLER R; MELICA D.; GAVIN WG.; ECHELARD Y.; KRISHER R.L; BEHBOOD E. Development of goat embryos after in vitro fertilization and parthenogenetic activation by different methods. **Theriogenology** 55:1933–1945, 2001.

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.

SANTOS, E. C. S.; PRADIEE, J.; Gonçalves, A. O.; MIRAPALHETA, E. M.; LAZZARI, J. C. ; Cardoso, T. F.; SCHIAVON, R. S. ; Pegoraro, L.M.C. ; MONDADORI, R. G. ; VIEIRA, A. D.; LUCIA JR, T. Different media used for selection of competent swine oocytes with Brilliant Cresyl Blue staining. **Reproduction in Domestic Animals**, Canadá, 2012. v. 47. p. 115-116, 2012.

SHIRAZI, A.; SHAMS-ESFANDABADI, N.; HOSSEINI, S. M. A comparasion of two recovery methods of ovine oocytes for in vitro maturation. **Small Ruminant Research**, v. 58, p. 283-286, 2005.

TATEMOTO, H.; MUTO, N.; SUNAGAWA, I.; SHINJO, A.; NAKADA. Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stres during in vitro maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. **Biology and Reproduction**, v. 71, p. 1150- 1157, 2005.

WANI N.A.; WANI G.M.; KHAN M.Z.; SALAHUDIN S. Effect of oocyte harvesting techniques on in vitromaturation and in vitro fertilization in sheep. **Small Rumin Res**, v.36, p.63-67, 2000.

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**, v. 66, p.366-72, 2006.

YOSHIOKA, K.; SUZUKI, C.; TANAKA, A.; ANAS, I. M.; IWARA, S.; Birth of piglets derived from porcine zygotes cultures in a chemically defined medium. **Biol Reprod**, v. 66, p. 112-19, 2002.