

# INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE FECUNDAÇÃO *IN VITRO* E DAS CÉLULAS DO *Cumulus oophorus* SOBRE A TAXA DE POLISPERMIA E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

MELISSA SAVOIA CASTILHO CUNHA,<sup>1</sup> MARIANA GROKE MARQUES,<sup>2</sup> ALECSANDRA SOBREIRA LIMA,<sup>3</sup>  
ALESSANDRA CORALLO NICACIO,<sup>4</sup> MAYRA ELENA ORTIZ DAVILA ASSUMPÇÃO<sup>4</sup> E JOSÉ ANTONIO VISINTIN<sup>4</sup>

1. Médica veterinária, Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo  
2. Doutora em Reprodução Animal, Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. E-mail: marigroke@gmail.com  
3. Mestre em Reprodução Animal, Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo  
4. Doutores em Reprodução Animal, Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura (37 ou 38,5°C) de fecundação *in vitro* (FIV) e da retirada das células do *Cumulus oophorus* após a FIV ou após doze horas de cultivo embrionário (CIV), nos índices de poliespermia e no desenvolvimento de embriões suínos *in vitro*. Para a FIV, incubaram-se oócitos e espermatozoides em duas temperaturas (37 ou 38,5°C). Após as oito horas de FIV, metade dos zigotos de cada grupo teve as células do *Cumulus oophorus* retiradas e foi colocada em meio de cultivo NCSU23. Colocou-se a outra metade apenas em meio de cultivo e ambos os grupos foram mantidos nas mesmas temperaturas da

FIV. Após doze horas de CIV, retiraram-se as células do restante dos zigotos e aferiram-se os índices de poliespermia, de todos os grupos. Na segunda etapa do experimento, os zigotos permaneceram em cultivo para avaliação do desenvolvimento embrionário. Não houve efeito da temperatura de FIV e da retirada das células do *Cumulus oophorus* após doze horas de cultivo nos índices de poliespermia e no desenvolvimento embrionário ( $p < 0,05$ ). Concluiu-se que a temperatura de FIV e a presença das células do *Cumulus oophorus* pós-fecundação não interferiram nos índices de poliespermia e no desenvolvimento embrionário.

**PALAVRAS-CHAVES:** Célula do *Cumulus oophorus*, fecundação *in vitro*, poliespermia, suíno, temperatura.

## ABSTRACT

INFLUENCE OF *IN VITRO* FERTILIZATION TEMPERATURE AND THE *Cumulus oophorus* CELLS ON THE POLYSPERMY AND EMBRYO DEVELOPMENT RATES

Effects of *in vitro* fertilization (IVF) temperature and *Cumulus oophorus* cells removal after IVF or 12 h of embryo culture (IVC) on polyspermy and embryo development rates were evaluated in swine. Oocytes and spermatozoa were incubated at 37 or 38.5°C during IVF procedure. *Cumulus oophorus* cells were removed from 50% of zygotes of each group 8 hours after IVF and all zygotes were cultured with NCSU23 media. Polyspermy rates

were assessed after 12 hours of IVC, when *cumulus oophorus* cells were removed from the rest of zygotes. In a second experiment, embryos remained in culture for the evaluation of embryo development. No effects of IVF temperature or *Cumulus oophorus* cells removal were observed after 12 hours of IVC on polyspermy and embryo development ( $p < 0.05$ ). In conclusion, IVF temperature and the presence of *Cumulus oophorus* cells after IVF do not interfere on polyspermy and embryo development rates.

**KEYWORDS:** *Cumulus oophorus* cells, *in vitro* fertilization, polyspermy, swine, temperature.

## INTRODUÇÃO

A produção de embriões suínos *in vitro* (PIV) é pré-requisito para o desenvolvimento de biotecnologias que resultam na produção de animais transgênicos, quimeras e clones, pois possibilita a obtenção de embriões em diferentes estágios, os quais são necessários para a aplicação dessas técnicas. Os recentes progressos nas técnicas de maturação *in vitro* (MIV) e fecundação *in vitro* (FIV) aumentaram a viabilidade embrionária e o número de embriões disponíveis para estudos do desenvolvimento embrionário pré-implantacional (TATEMOTO et al., 2005).

No entanto, ainda existem fatores limitantes que comprometem a produção de embriões em larga escala. Por exemplo, na espécie suína, as variações nos índices de penetração espermática (50-90%), de poliespermia (5-91%), de clivagem (20-75%) e de blastócitos (2-36%) (NIEMANN & RATH 2001) reduzem a eficiência da FIV. A poliespermia pode ser definida como a penetração de dois ou mais espermatozoides em um único oócito, e fatores como o oócito, o espermatozoide e as condições não adequadas de FIV podem predispor a sua ocorrência (WANG et al., 2003).

No sistema *in vitro*, grande quantidade de espermatozoides capacitados entra em contato com o oócito maturo no momento da FIV, podendo colaborar para os altos índices de poliespermia (CLARK et al., 2005). O microambiente da fecundação deve ser melhor estudado, considerando os processos de seleção e capacitação dos espermatozoides, a suplementação do meio e as condições de cultivo, visando à diminuição drástica da poliespermia (COY & ROMAR, 2002).

NAITO et al. (1989) demonstraram o papel da temperatura no cultivo embrionário. Em seu experimento, o tempo da primeira clivagem foi menor em embriões fecundados a 39°C (25 a 27 horas após a inseminação) quando comparado em embriões fecundados a 37°C (32 a 34 horas após a inseminação). Resultado semelhante foi alcançado por OCAMPO et al. (1994), que observaram clivagem entre vinte e trinta horas a 39°C. Temperaturas entre 38,5 e 39°C são utilizadas para FIV em muitas espécies domésticas, pois nestas uma quantidade maior de espermatozoides estaria maturo e, assim, capaz de fecundar. No entanto, seu papel na poliespermia ainda é desconhecido (WANG et al., 2003).

Este estudo apresenta os resultados de fecundação realizada *in vitro* a 37°C, visando diminuir a incidência de poliespermia, possivelmente por promover um atraso/diminuição da penetração dos espermatozoides.

Muitos pesquisadores ressaltam a importância da permanência das células do *Cumulus oophorus* no momento da FIV, pois elas possuem um papel importante na fecundação monospermica (SOOM et al., 2002; TATEMOTO et al., 2005), dado seu efeito positivo na capacitação e penetração espermática, na formação do prónucleo masculino e na prevenção do endurecimento da zona pelúcida durante o processo de FIV (TANGHE et al., 2002). WONGSRIKEAO et al. (2005) demonstraram, em seus estudos, que a presença das células do *Cumulus oophorus* na FIV teve um efeito positivo no desenvolvimento do embrião. Este efeito pode ser devido a invaginações dessas células que adentram a zona pelúcida e o espaço perivitelínico, sugerindo exercer papel importante no microambiente (BONDIOLI et al., 1995; FAMILIARI et al., 1998). Dessa forma, desenvolveu-se neste estudo um experimento para testar a permanência dessas células em contato com o oócito por um período prolongado, mesmo após a fecundação. Trata-se de procedimento que poderá ser benéfico tanto para a diminuição da poliespermia quanto, principalmente, no posterior desenvolvimento embrionário.

Futuras pesquisas que visam otimizar as condições de MIV e FIV podem minimizar a poliespermia, promovendo a maior eficiência do sistema de PIV em suínos. Assim, o presente trabalho avaliou os efeitos de duas temperaturas de fecundação *in vitro* (37 ou 38,5°C) e da retirada das células do *Cumulus oophorus* após a fecundação *in vitro* ou após doze horas de cultivo sobre os índices de poliespermia e a produção de mórulas e de blastocistos em suínos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados neste estudo foram fabricados pela Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, MO, USA). Utilizaram-se ovários oriundos de matadouro, os quais foram transportados ao laboratório à temperatura entre 25 e 28°C. Aspiraram-se os folículos entre 2 e 5mm com agulhas 18G acopladas a seringas de 10mL, sendo o fluido folicular colocado em tubos

cônicos de 50mL para a sedimentação. Selecionaram-se, para HIV, somente oócitos que apresentavam camada de células do *Cumulus oophorus* espessa e compacta e citoplasma com granulações homogêneas.

Realizou-se a maturação oocitária em estufa a 38,5°C, 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada por 44 horas. Para isso os complexos oócitos – *Cumulus oophorus* (COCs) – foram incubados em meio de maturação NCSU23, adicionado de 50UI/mL de gentamicina, 0,57mM de cisteína e 10% de FFS (fluido folicular suíno) e suplementado com 10UI de eCG/mL (Folligon®, Intervet International B.V., Boxmeer, The Netherlands) e 10UI de hCG/mL (Chorulon®, Intervet International B.V., Boxmeer, The Netherlands) por 22 horas em gotas de 90 µL de meio e cobertas de óleo mineral. No segundo período de maturação (22 horas), esses complexos oócitos (COCs) foram incubados em meio de maturação, porém sem adição de hormônios, perfazendo um total de 44 horas de maturação.

Para a FIV, a fração rica do sêmen foi colhida pelo método de mão enluvada e diluída em BTS (Beltsville Thawing Solution®, IMV, São Paulo, Brasil) a 37°C na concentração de 1,5X10<sup>8</sup> células/mL e mantida por duas horas a 25°C, sendo resfriada e armazenada à temperatura entre 15 e 18°C por 24 horas. No momento da FIV, centrifugou-se o sêmen a 200 x g por três minutos, para separação dos espermatozoides vivos (sobrenadante) e mortos (sedimento). O sobrenadante foi centrifugado a 1200 x g por três minutos e o sedimento ressuspenso em NaCl 0,9% contendo 1mg/mL de BSA e 50UI/mL de gentamicina e centrifugado a 1.200 x g por três minutos. Retirou-se o sobrenadante, sendo o sedimento ressuspenso em meio TBM (Tris Buffer Medium) suplementado com 2 mM de cafeína e 1mg/mL BSA na concentração de 1X10<sup>6</sup> espermatozoides/mL. Incubou-se o sêmen para capacitação em estufa a 37 ou 38,5°C, 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada por noventa minutos. Após 44 horas de maturação, os oócitos foram lavados três vezes e transferidos para gotas de 200 µL em TBM suplementado com 2mM de cafeína e 1mg/mL BSA sob óleo mineral. Dividiram-se os oócitos em dois grupos, os quais foram mantidos em estufas à temperatura de 37°C ou de 38,5°C, 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada. Uma alíquota de 200µL da suspensão de espermatozoides capacitados foi adicionada em cada gota que continha os oócitos.

Após as oito horas da inseminação, lavaram-se os presumíveis zigotos em meio de cultivo NCSU23 suplementado com 0,4% de BSA e em metade dos zigotos de cada um dos grupos (37°C ou de 38,5°C) procedeu-se à retirada das células do *Cumulus oophorus* com auxílio de pipeta automática. A outra metade dos zigotos permaneceu na presença das células do *Cumulus oophorus* nas primeiras doze horas do desenvolvimento embrionário, quando estas foram então retiradas. Cultivaram-se os embriões em gotas de 100µL (em média, vinte embriões por gotas) de meio de cultivo NCSU23 suplementado com 0,4% de BSA, em estufa a 38,5°C, 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada.

No primeiro experimento, os zigotos de cada um dos quatro grupos foram fixados e corados para avaliação dos índices de poliespermia. Para isso, após as doze horas de cultivo, os zigotos foram fixados por incubação por cinco minutos em formamida a 1% em PBS para fixação e transferidos para o 0,01% de Triton 100X por doze horas. Procedeu-se à retirada da zona pelúcida pela exposição, por seis minutos, à tripsina 2% em PBS, sem cálcio e magnésio, sendo os zigotos colocados entre lâmina e lamínula em gotas de Mowiol com 10µl/mL de Hoechst 33342, para avaliação dos índices de poliespermia, em microscópio invertido de epifluorescência e objetiva de 40X, conforme OCAMPO et al. (1994). Foram considerados zigotos polispermicos aqueles com dois ou mais espermatozoides penetrados (descondensados ou não). Para cada grupo experimental, efetuaram-se doze repetições, com em média dez oócitos por grupo.

No segundo experimento, os zigotos (dos quatro grupos descritos) foram mantidos em cultivo por sete dias para avaliação do desenvolvimento embrionário. Após 72 horas de cultivo, transferiram-se os embriões para gotas de 100µL de meio de cultivo suplementado com 20% de SFB (soro fetal bovino), os quais foram mantidos em estufa a 38,5°C, 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada. Avaliou-se o desenvolvimento embrionário pelos índices de mórula, blastocisto e eclosão no sétimo dia após a inseminação. Para cada grupo experimental, efetuaram-se sete repetições, com em média quinze oócitos por grupo.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) por meio do programa computacional Statistica® para Windows. Utilizou-se o delineamento fatorial 2 x 2, para testar os efeitos da temperatura de

capacitação e de fecundação *in vitro* (37 ou 38,5°C) e do momento da retirada das células do *Cumulus oophorus* (após a FIV ou após doze horas de cultivo). Para a comparação das médias, empregou-se o método de Tukey, com o nível de significância de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

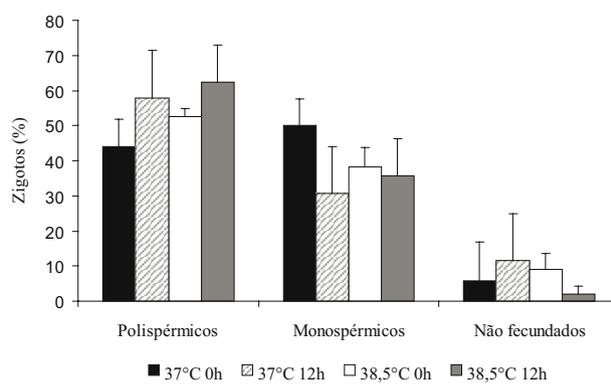
Uma vez que a poliespermia ainda é um entrave à produção *in vitro* em suínos, este estudo visou avaliar variáveis como a temperatura de fecundação e a retirada das células do *Cumulus oophorus* após a FIV ou após doze horas de cultivo. A melhor combinação de fatores poderia minimizar a porcentagem de zigotos poliespermicos fecundados *in vitro* e estabelecer um protocolo para avaliação rotineira dos índices de poliespermia.

Primeiramente, observou-se que o procedimento adotado para avaliação dos zigotos quanto à poliespermia após a inseminação *in vitro* mostrou-se adequado. O uso do Triton foi eficaz no tratamento dos oócitos suínos, pois digeriu parte da gordura, aumentando o número de estruturas visualizadas. A marcação fluorescente utilizada (Hoechst 33342), quando diluída em Mowiol, foi eficiente em manter a fluorescência por três meses em geladeira, sem perda da qualidade das lâminas, o que permite refazer, se necessário, as avaliações.

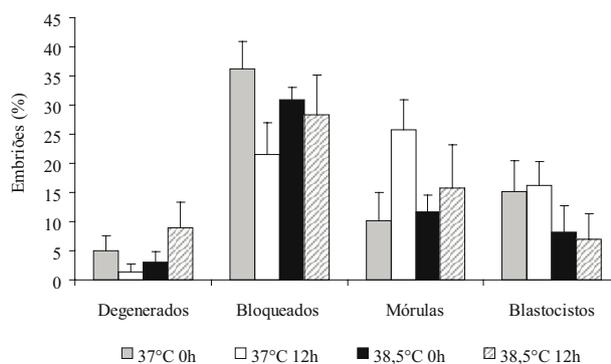
Não se verificou efeito da temperatura de inseminação nos índices de monospermia, tanto nos oócitos que tiveram as células do *Cumulus oophorus* retiradas logo após a FIV quanto nos oócitos cujas células foram retiradas após doze horas de cultivo ( $p > 0,05$ ). Também não houve efeito do tratamento temperatura ( $p > 0,05$ ) nos índices de zigotos poliespermicos e de estruturas não fecundadas (Figura 1).

As diferentes temperaturas de fecundação não interferiram no posterior desenvolvimento embrionário (Figura 2). Sabe-se que há uma tendência de atraso no desenvolvimento embrionário quando os embriões são cultivados a 37°C, o que ocorre, provavelmente, por demora na penetração do espermatozoide e na formação do pronúcleo masculino (KIDSON et al., 2001). Porém, neste estudo, a diminuição da temperatura para 37°C durante o período de fecundação não acarretou atraso na penetração do espermatozoide, já que não resultou em diminuição dos índices de poliespermia.

Com a pré-capacitação do sêmen, provavelmente no momento da inseminação havia grande número de espermatozoides aptos a fecundar e, assim, a tentativa de diminuição do metabolismo dos espermatozoides com a diminuição da temperatura não foi suficiente para evitar que mais de um espermatozoide pré-capacitado penetrasse nos oócitos. Dessa forma, não ocorreu diminuição nos índices de poliespermia, o que sugere que, nas condições deste trabalho, a temperatura de 37°C não diminuiu a capacidade de fecundação/metabolismo dos espermatozoides.



**FIGURA 1.** Efeito das temperaturas de inseminação 37°C ou 38,5°C e da retirada das células do *Cumulus oophorus* após a FIV (0h) ou após doze horas de cultivo (12h), nos índices de poliespermia, monospermia e oócitos não fecundados *in vitro* em suínos. Os dados representam a porcentagem média de zigotos  $\pm$  erro-padrão.  $p \leq 0,05$ .



**FIGURA 2.** Efeito das temperaturas de inseminação 37°C ou 38,5°C e da retirada das células do *Cumulus oophorus* após a FIV (0h) ou após doze horas de cultivo (12h), no desenvolvimento de embriões suínos *in vitro*. Os dados representam a porcentagem média de embriões  $\pm$  erro-padrão.  $p \leq 0,05$ .

Como não se observou diminuição de penetração dos oócitos pelos espermatozoides, não foi registrado efeito benéfico do tratamento no desenvolvimento embrionário subsequente, acarretando baixo desenvolvimento embrionário, possivelmente pela baixa qualidade dos embriões. ABEYDEERA (2002) descreve que blastocistos oriundos de oócitos com vários pronúcleos possuem menor número de células, principalmente na massa celular interna, do que blastocistos oriundos de oócitos com dois pronúcleos.

Não houve efeito da permanência das células do *Cumulus oophorus* após o período de fecundação nos índices de poliespermia ( $p > 0,05$ ), visto que não se notou diferença tanto entre os grupos fecundados a 37°C quanto nos fecundados a 38,5°C (Figura 1). O momento de retirada das células do *Cumulus oophorus* não interferiu no posterior desenvolvimento embrionário (Figura 2). Importante salientar que também não foi observada interação entre as variáveis independentes utilizadas (temperatura e momento da retirada das células do *Cumulus oophorus*).

OTOI et al. (2005), em seus estudos, demonstram que a presença das células do *Cumulus oophorus* na fecundação *in vitro* produziu um efeito positivo no posterior desenvolvimento do embrião. Porém, neste estudo, com o uso da metodologia descrita, observou-se que a presença da célula do *Cumulus oophorus* após o período de fecundação não melhorou os índices avaliados.

Durante o período de fecundação a principal função das células do *Cumulus oophorus* está relacionada à fusão entre espermatozoide e oócitos. Já posterior a este período, como descrito por BONDIOLI et al. (1995), a presença de células somáticas no cultivo *in vitro* de embriões está relacionada à produção de fatores tróficos, à promoção na diferenciação do embrião por produtos das células em cultivo e à detoxicação do meio de cultivo, sequestrando radiais livres.

Possivelmente, pelo curto período de permanência em contato com os zigotos pós-fecundação (doze horas), a ação das células com a produção dos fatores anteriormente descritos não teve efeito nos parâmetros avaliados.

Apesar de não ter havido efeito dos tratamentos empregados neste trabalho, o procedimento-padrão adotado para a realização da fecundação *in vitro* se mostrou adequado, pois quando comparado com

resultados de índices de poliespermia obtidos por outros autores – 52,2±5,3 (TATEMOTO et al., 2005), 85,8±1,3 (KOO et al., 2005), 52,4±2,2 (LI et al., 2003) e 59,1±5,7 (SA et al., 2006) – os índices obtidos de poliespermia foram satisfatórios.

## CONCLUSÃO

A temperatura de fecundação *in vitro* (37°C ou 38,5,5°C) e a presença das células do *Cumulus oophorus* pós-fecundação não interferiram nos índices de poliespermia e no desenvolvimento embrionário de embriões suínos produzidos *in vitro*.

## REFERÊNCIAS

- BONDIOLI, K.R.; HAEK, H.W.; WALL, R.L. Effect of glycine and alanine on co-culture of bovine blastocysts. **Theriogenology**, v. 43, p. 514-520, 1995.
- CLARK, S.G.; HAUBERT, K.; BEEBE, D.J.; FERGUSON, E.; WHEELER, M.B. Reduction of polyspermic penetration using biomimetic microfluidic technology during *in vitro* fertilization. **The Royal Society of Chemistry**, v. 5, p. 1229-1232, 2005.
- COY, P.; ROMAR, R. *In vitro* of pig embryos: a point of view. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 14, p. 275-286, 2002.
- FAMILIARI, G.; VERLENGIA, C.; NOTTOLA, S.A.; TRIPODI, A.; HYTTLE, P.; MACCHIARELLI, G.; MOTTA, P.M. Ultrastructural features of bovine cumulus-corona cells surrounding oocytes, zygotes and early development. **Reproduction Fertility Development**, v. 10, p. 315-326, 1998.
- KIDSON, A.; COLENBRANDER, B.; VERHEIJDEN, J.H.M.; BEVERS, M.M. Polyspermia in the pig is dependent on both IVF medium and sperm dose during fertilization *in vitro*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PIG REPRODUCTION, 6., 2001. Missouri. **Proceedings**... University of Missouri, 2001. p. 75. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12035750>>
- NAITO, K.; FUKUDA, Y.; ISHIBASHI, I. Developmental ability of porcine ova matured in porcine follicular fluid *in vitro* and fertilized *in vitro*. **Theriogenology**, v. 31, p. 1049-57, 1989.
- NIEMANN, H.; RATH, D. Progress in reproductive biotechnology in swine. **Theriogenology**, v. 56, p. 1291-1304, 2001.
- OCAMPO, M.B.; OCAMPO, L.C.; MORI, T.; UEDA, J.; KANAGAWA, H. Timing of sequential changes in chromosome configurations during the second meiotic division and cytoplas-

mic events of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v. 34, p. 281-288, 1994.

SOOM, A.V.; YUAN, Y.Q.; PEELMAN, L.J.; DE MATOS, D.G.; DEWULF, J.; LAESENS, H.; DE KRUIF, A. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos culture under different oxygen tensions with ou without cysteine addition. **Theriogenology**, v. 57, p. 1453-1465, 2002.

TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; NAUWYNCK, H.; CORYN, M.; DE KRUIF, A. Functions of the *cumulus oophorus* during oocyte maturation, ovulation and fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 414-424, 2002.

TATEMOTO, H.; MUTO, N.; SUNAGAWA, I.; SHINJO, A.; NAKADA. 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 and Reproduction**, v. 71, p. 1150-1157, 2005.

WANG, W.; DAY, B.N.; WU, G. How does polyspermy happen in mammalian oocytes? **Microscopy Research and Technique**, v. 61, p. 335-341, 2003.

WONGSRIKEAO, P.; KANESHIGE, Y.; OOKI, R.; TANIGUCHI, M.; AGUNG, B.; NII, M.; OTOI, T. Effect of the removal of *cumulus oophorus* cells on the nuclear maturation, fertilization and development of porcine oocytes. **Reproduction Domestic Animal**, v. 40, p. 166-170, 2005.

---

Protocolado em: 28 jan. 2008. Aceito em: 23 dez. 2009.