



GUILHERME OBERLENDER

**IGF-I NO FLUIDO FOLICULAR UTILIZADO NA
MATURAÇÃO E FECUNDAÇÃO *IN VITRO* EM
SUÍNOS**

LAVRAS - MG

2012

GUILHERME OBERLENDER

**IGF-I NO FLUIDO FOLICULAR UTILIZADO NA MATURAÇÃO E
FECUNDAÇÃO *IN VITRO* EM SUÍNOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Luis David Solis Murgas

Coorientadores

Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo

Dr^a. Mônica Rodrigues Ferreira Machado

LAVRAS – MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Oberlender, Guilherme.

IGF-I no fluido folicular utilizado na maturação e fecundação *in vitro* em suínos / Guilherme Oberlender. – Lavras : UFLA, 2012.
129 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Luis David Solis Murgas.

Bibliografia.

1. Embriões suínos *in vitro*. 2. FIV. 3. Folículos. 4. MIV. 5. Fatores de crescimento. 6. Produção *in vitro*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.4089264

GUILHERME OBERLENDER

**IGF-I NO FLUIDO FOLICULAR UTILIZADO NA MATURAÇÃO E
FECUNDAÇÃO *IN VITRO* EM SUÍNOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 09 de novembro de 2012.

Dr. Luis David Solis Murgas	UFLA
Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo	UFLA
Dr ^a . Elenice Andrade Moraes	UNIVASF
Dr ^a . Nadja Gomes Alves	UFLA
Dr. Juliano Vogas Peixoto	UFLA

Dr. Luis David Solis Murgas
Orientador

LAVRAS – MG

2012

Aos meus pais Marcos e Elizabeth, pelo inigualável exemplo de pessoa e dedicação em tudo o que é realizado na vida. E por todo esforço e incentivo que me deram, desde a minha infância, com o objetivo de me proporcionarem tudo o que ninguém irá retirar de mim: “O ESTUDO”. E também por terem participado ativamente de todas as minhas conquistas.

Aos meus irmãos, Daniel e Cecília pelo grande apoio em tudo que realizei em minha vida e em todos os momentos em que precisei e, em especial ao Samuel, pela alegria que sempre demonstra, sendo uma motivação para que eu realize todos meus sonhos.

À Adriana, por todo o apoio e incentivo em tudo que realizei, pela paciência e dedicação que sempre demonstrou em todos os momentos de dificuldade. Tudo foi mais fácil com a sua presença. Você está e estará sempre em meu coração. Obrigado por tudo!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Zootecnia e ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, pela oportunidade concedida para a realização do Doutorado, desenvolvimento do projeto e aprimoramento dos meus conhecimentos.

Ao Departamento de Medicina Veterinária, pelo apoio desde a graduação em todos os projetos e pesquisas por mim realizados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro concedido para a realização do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro na aquisição dos equipamentos utilizados na pesquisa e concretização da montagem do Laboratório de Fertilização *in vitro* e cultivo de embriões de suínos.

Ao Matadouro/Frigorífico NUTRILI, em nome de Pollyana de Souza e José Pereira Leite, pela fundamental colaboração e apoio no fornecimento de todo o material biológico utilizado no projeto. Assim como a todos os funcionários, em especial ao Ernando e aos funcionários da exsanguinação, pela ajuda, paciência e amizade.

Ao Prof. Dr. Luis David Solis Murgas, pelos seis anos de convivência e por todo o incentivo, apoio e oportunidade a mim concedida para concretizar esse sonho tão esperado. Pela grande amizade e por todos os ensinamentos tanto profissionais como pessoais.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo, pela disponibilidade de apoio financeiro para a realização da pesquisa através do projeto CAPES/PNPD Institucional. Além disso, por ter me acompanhado desde

o início de minha vida acadêmica, pelos conselhos e por me ajudar sempre com muita boa vontade e dedicação. Você é um exemplo que sempre irei seguir.

Aos membros da banca de avaliação, Dr^a. Elenice Andrade Moraes, Dr^a. Nadja Gomes Alves e Dr. Juliano Vogas Peixoto por terem se disponibilizado e aceitado o convite para participar e colaborar com esse trabalho, compartilhando seus conhecimentos.

À Dr^a Monica Rodrigues Ferreira Machado pelas sugestões e idéias compartilhadas durante a execução do projeto.

Aos amigos Tila, Thais e Gabriel, pelo tempo compartilhado no laboratório e ajuda durante a execução dos experimentos. Sem a ajuda de vocês esse trabalho seria impossível de ser concluído.

A todos os membros do Grupo de Reprodução de Suínos (atuais e os anteriores) que desde o meu terceiro período da graduação têm colaborado com todas as pesquisas desenvolvidas.

A todos os amigos, Salvador, Pilar, Raquel, Carmen, Joaquin, Luis, Jon e Juan, do Laboratório de Reprodução da Faculdade de Veterinária da Universidade de Murcia/Espanha, que me ajudaram nesse projeto, principalmente nas opiniões e resolução das dúvidas relativas aos protocolos e às metodologias utilizadas.

A meus pais Marcos e Elizabeth pela dedicação, confiança, preocupação e apoio incondicional durante todos esses anos longe de casa. Aos meus irmãos Daniel, Cecília e Samuel, pela paciência, incentivo e por sempre torcerem por mim.

À Adriana, que durante todos nossos anos juntos, tem sido minha amiga, companheira, colega de trabalho, psicóloga, psiquiatra e, acima de tudo, minha grande incentivadora de todo esse trabalho. E à sua família, que também considero como minha, pelo apoio e consideração.

Aos professores do DMV/UFLA, Antônio Marcos Guimarães, Christian Hirsch, Geraldo Márcio da Costa, Luciano José Pereira e Raimundo Vicente de Souza pela ajuda em várias etapas do projeto.

Ao funcionário Willian Cesar Cortez do Setor de Fisiologia e Farmacologia pela amizade e colaboração em toda a execução do projeto.

À Estefânia de Souza Andrade pelo auxílio na mensuração da osmolaridade dos meios de manipulação utilizados, à Daniella Aparecida de Jesus Paula pelo auxílio na utilização do microscópio estereoscópico, à Vivian de Oliveira Silva pela ajuda na realização do ensaio ELISA e também ao Joelson pela sua dedicação e boa vontade na manutenção da limpeza e higiene do laboratório durante todo o experimento.

À Prof^a. Antônia dos Reis Figueira (DFP/UFLA) e a técnica de laboratório Luciana de Paiva Godinho (DFP/UFLA) pela ajuda e disponibilização do leitor de microplacas utilizado na quantificação do IGF-I.

Ao Prof. Eduardo Alves (DFP/UFLA) pela ajuda e disponibilização do microscópio de epifluorescência utilizado na avaliação dos resultados da fertilização. Assim como ao Prof. Antônio Chalfun Júnior (DBI/UFLA) pela disponibilização e fornecimento da água ultra-pura (Milli-Q) utilizada na preparação de todas as soluções e meios de cultivo.

Ao Fábio, Léo, Tiago, Charles, Luciano e Priscila pela grande amizade e apoio desde a graduação.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a minha formação e, a Deus que sempre esteve ao meu lado e sempre me deu forças para conseguir vencer todas as dificuldades em minha vida.

*"Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível e, de repente, você
estará fazendo o impossível".*

São Francisco de Assis
(5 de julho de 1182 – 3 de outubro de 1226)

“A ciência é longa e a vida é breve”.

Lúcio Aneu Séneca
(4 a.C – 65 d.C)

RESUMO

Objetivando-se avaliar as concentrações fisiológicas de IGF-I presente no fluido folicular (FF) de folículos ovarianos de diferentes diâmetros e a influência da adição desse hormônio na maturação *in vitro* (MIV) e fertilização *in vitro* (FIV) em suínos, dois experimentos foram conduzidos. No experimento 1, ovários (n = 1.000) de 500 fêmeas pré-púberes foram obtidos em matadouro. Os folículos localizados na superfície de cada ovário foram classificados em pequenos (FPs, 2 a 5 mm de diâmetro) e grandes (FGs, 6 a 10 mm de diâmetro) e o FF obtido a partir da aspiração dos mesmos. A partir do *pool* de FF obtido, determinou-se a concentração de IGF-I livre. A concentração de IGF-I ($170,92 \pm 88,29$ ng/mL) foi superior ($P < 0,05$) nos FGs em comparação com os FPs ($67,39 \pm 49,90$ ng/mL), sendo isso relacionado à maior atividade dos FGs e à diferenciação que os mesmos sofrem para a ovulação. A partir desses resultados, no experimento 2 foi realizada a MIV de ovócitos suínos com a suplementação de FF oriundo dos FPs (FFPs) e FGs (FFGs) e a adição de IGF-I com níveis correspondentes a 0, 50, 100, 150 e 200% das concentrações fisiológicas médias entre os FPs e FGs. Ovócitos foram obtidos de ovários de fêmeas pré-púberes e maturados em meio NCSU-37 suplementado com 10% de FF (FFPs e FFGs) e IGF-I (0, 60, 120, 180 e 240 ng/mL). Após a MIV, os ovócitos foram fertilizados e cultivados por um período de 18 horas, sendo fixados em solução Hoechst para avaliação da MIV e FIV. A taxa de maturação, penetração, monospermia, eficiência da FIV, formação de pronúcleos, número de espermatozoides por ovócito penetrado e aderidos à zona pelúcida foram avaliados. Observou-se que a adição de IGF-I ao meio de MIV com o uso de FFPs teve efeito positivo ($P < 0,01$) na MIV e na FIV, igualando-se ao uso de FFGs sem a adição de IGF-I. Obteve-se efeito quadrático ($P < 0,01$) do IGF-I com o uso de FFPs sobre a maturação, penetração, monospermia e eficiência da FIV. Entretanto, o IGF-I não apresentou efeito ($P > 0,05$) na MIV e FIV com o uso de FFGs. Houve diferença ($P = 0,01$) na formação de pró-núcleos apenas entre os FFPs e FFGs. O número de espermatozoides penetrados por ovócito e aderidos à zona pelúcida foi semelhante ($P > 0,05$) com o uso dos dois tipos de FF e IGF-I. A partir das equações obtidas para o uso de IGF-I com FFPs, observou-se que a adição de IGF-I entre 129 e 179 ng/mL ao meio de MIV promove resultados semelhantes aos obtidos com o uso de FFGs. Conclui-se que a adição de IGF-I ao meio de MIV com o uso de FFPs aumenta a maturação e melhora os resultados de FIV. Esses achados evidenciam que o IGF-I desempenha importante função na MIV e FIV de ovócitos suínos quando utilizado FFPs.

Palavras-chave: Fatores de crescimento. FIV. Folículos. MIV. Produção *in vitro* de embriões suínos.

ABSTRACT

In order to evaluate the IGF-I physiological concentrations presented in the porcine follicular fluid (FF) of ovarian follicles with different diameters and the influence of this hormone addition in the *in vitro* maturation (IVM) and *in vitro* fertilization (IVF), two experiments were conducted. In experiment 1, ovaries (n = 1,000) from 500 prepubertal gilts were obtained in a slaughterhouse. The follicles located on the surface of each ovary were classified as small (SFs, 2 to 5 mm in diameter) or as large (LFs, 6 to 10 mm in diameter) and FF was obtained from aspiration of these follicles. IGF-I concentration was obtained from the *pool* of FF in each category. The concentration of IGF-I (170.92 ± 88.29 ng/mL) was higher ($P < 0.05$) in LFs when compared with the SFs (67.39 ± 49.90 ng/mL), being this fact related to the increased activity of the LFs and to its differentiation to the ovulation. From these results, in experiment 2 was performed IVM of pig oocytes with the addition of FF from the SFs (SFFs) and from the LFs (LFFs) and with the addition of IGF-I with respectively levels of 0; 50; 100; 150 and 200% of averaged physiological concentrations between SFs and LFs. Oocytes were obtained from ovaries of prepubertal gilts and matured in NCSU-37 medium supplemented with 10% FF (SFFs and LFFs) and IGF-I (0; 60; 120; 180 and 240 ng/mL). After IVM, oocytes were fertilized and cultured for a period of 18 hours and fixed in a Hoechst solution to evaluate the IVM and IVF. The rate of maturation, penetration, monospermy, performance of IVF, the formation of pronucleus, the number of sperm per penetrated oocyte and the number of sperm adhered to the zona pellucida were evaluated. It was observed that the addition of IGF-I in IVM medium using SFFs had a positive effect ($P < 0.01$) on the results of IVM and IVF, being similar to those with LFFs without IGF-I addition. It was obtained a quadratic relationship ($P < 0.01$) of IGF-I with the use of SFFs on maturation, penetration, monospermy and performance of IVF. However, IGF-I had no effect ($P > 0.05$) in IVM and IVF using LFFs. There was difference ($P = 0.01$) in the formation of pronucleus only between SFFs and LFFs. The number of penetrated sperm per oocyte and the number of sperm adhered to the zona pellucida was similar ($P > 0.05$) with the use of the two types of FF and the levels IGF-I. From the equations obtained for the use of IGF-I with SFFs was observed that the addition of IGF-I between 129 and 179 ng/mL to IVM medium promotes similar results to those obtained using LFFs. In conclusion, the addition of IGF-I in IVM medium using SFFs increases maturation and improves the results of IVF. These findings suggest that IGF-I plays an important role in IVM and IVF of porcine oocytes when using SFFs.

Keywords: Follicles. Growth factors. *In vitro* production of pig embryos. IVF. IVM.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Ovócitos suínos polispérmicos. A) Ovócito penetrado por dois espermatozoides, sendo visualizados três pró-núcleos (setas), sendo um feminino e dois masculinos. B) Ovócito penetrado por inúmeros espermatozoides, sendo possível visualizar vários pró-núcleos e espermatozoides em descondensação (setas).....	20
Figura 2	Descrição esquemática de um ovócito suíno maturado <i>in vitro</i> (ZP: zona pelúcida; EPV: espaço perivitelinico; CP: corpúsculo polar) (aumento de 400×).....	31
Figura 3	O sistema IGF. Os componentes incluem os peptídeos IGF-I e IGF-II, IGFBP-1 a -6, IGFBP-rPs, protease das IGFBPs, receptores do IGF-I e -II e potenciais receptores IGFBPs e IGFBP-rPs. M6P, Manose-6-fosfato.....	35
Figura 4	Estrutura do receptor de IGF-I (IGF-IR). O IGF-IR é um membro dos receptores tirosina quinase, contendo múltiplos sítios intracelulares de fosforilação.....	38
Figura 5	Representação simplificada dos componentes intracelulares do sistema IGF-I e suas ações após a ativação do IGF-IR pelo IGFs (I e II).....	39
Figura 6	Vias propostas de ação das proteínas de ligação aos IGFs1 e 2 (IGFBPs).....	41
Figura 7	Papéis hipotéticos das ações das proteases das IGFBPs no mecanismo fisiológico da liberação dos IGFs.....	43

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

Artigo 1

Figura 1	Concentração de IGF-I livre no FF coletado a partir de folículos pequenos (FFPs, 2 a 5 mm de diâmetro), folículos grandes (FFGs, 6 a 10 mm de diâmetro) e sangue de fêmeas suínas pré-púberes (n = 500).....	82
----------	--	----

Artigo 2

Figura 1	Efeitos da adição de fluido folicular (FF) e IGF-I exógeno no meio de maturação <i>in vitro</i> (MIV) sobre a maturação nuclear (%) de ovócitos suínos. Valores dados como média \pm desvio-padrão (N = 6 repetições/30 ovócitos cada).....	106
Figura 2	Efeitos da adição de fluido folicular (FF) e IGF-I exógeno no meio de maturação <i>in vitro</i> (MIV) sobre a penetração (%) e número de espermatozoides penetrados por ovócito. Valores de penetração dados como média \pm desvio-padrão (N = 6 repetições/30 ovócitos cada).....	110

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1	Homologia do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) e II (IGF-II) entre várias espécies.....	36
Tabela 2	Efeitos da adição de IGF-I nos meios de PIV de embriões (maturação <i>in vitro</i> – MIV, fertilização <i>in vitro</i> – FIV e cultivo <i>in vitro</i> – CIV) em diversas espécies animais.....	46

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

Artigo 1

Tabela 1	Número (média ± desvio-padrão) de folículos pequenos (FPs) e grandes (FGs) encontrados na superfície ovariana de fêmeas suínas pré-púberes (n = 100 ovários).....	80
Tabela 2	Níveis ovarianos e sanguíneos de IGF-I (ng/mL) em fêmeas suínas pré-púberes (n = 500).....	81

Artigo 2

Tabela 1	Efeitos da adição de fluido folicular (FF) e IGF-I exógeno no meio de maturação <i>in vitro</i> (MIV) sobre a maturação nuclear (%) (média ± desvio-padrão) de ovócitos suínos (N = 6 repetições/30 ovócitos cada).....	105
Tabela 2	Efeitos da adição de fluido folicular (FF) e IGF-I no meio de maturação <i>in vitro</i> (MIV) sobre os resultados de fertilização (média ± desvio-padrão) de ovócitos suínos (N = 6 repetições/30 ovócitos cada).....	109

LISTA DE ABREVIATURAS

PIV	Produção <i>in vitro</i>
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
FF	Fluido folicular
ZP	Zona pelúcida
GC	Grânulos corticais
IP3	1,4,5-trifosfato de inositol
EPV	Espaço perivitelínico
GETU	“Glicoproteína Específica da Tuba Uterina”
IGF-II	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo II
IGF-IR	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I
IGF-IIR	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo II
IGFBPs	Proteínas de ligação aos fatores de crescimento semelhante à insulina
IGF-III	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo III
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FSH	Hormônio folículo estimulante
LH	Hormônio luteinizante

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	16
1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	Fertilização <i>in vitro</i> em suínos (FIV).....	18
2.2	Polispermia	19
2.2.1	Fertilização de ovócitos imaturos	23
2.2.2	Fertilização de ovócitos velhos.....	25
2.2.3	Bloqueio da polispermia pela zona pelúcida	26
2.2.4	Número de espermatozoides.....	27
2.2.5	Papel das células e secreções da tuba uterina em bloquear a polispermia	29
2.3	Características morfológicas dos ovócitos maduros.....	30
2.4	Sistema fator de crescimento semelhante à insulina (Sistema IGF)	34
2.4.1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I e II.....	35
2.4.2	Receptor do IGF-I (IGF-IR) e suas funções.....	37
2.4.3	Proteínas de ligação aos IGFs (IGFBPs).....	39
2.4.4	Proteases das IGFBPs	42
2.5	IGF-I na reprodução de fêmeas suínas	44
2.6	Utilização do IGF-I na produção <i>in vitro</i> de embriões	45
2.7	Adição de fluido folicular no meio de maturação <i>in vitro</i> de ovócitos suínos.....	50
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	52
	REFERÊNCIAS.....	53
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	70
	ARTIGO 1: Concentração do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I no fluido folicular suíno coletado de folículos ovarianos de diferentes diâmetros (Submetido ao Periódico <i>Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition</i>)	70
	ARTIGO 2: Influência do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I na maturação e fertilização <i>in vitro</i> de ovócitos suínos utilizando fluido folicular proveniente de folículos ovarianos de diferentes diâmetros (Submetido ao Periódico <i>Theriogenology</i>).....	92
	ANEXOS.....	123

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões suínos é uma técnica importante para pesquisas em diversos campos da ciência. É fundamental no estudo dos mecanismos básicos envolvidos na fecundação e desenvolvimento embrionário, avaliação da capacidade fecundante dos espermatozoides, transgênese, clonagem, melhoramento genético e recuperação de raças em risco de extinção.

Apesar desses benefícios, a porcentagem de embriões suínos obtidos é muito baixa quando comparada a outras espécies. Entre as várias causas desse baixo rendimento podem ser destacados os problemas envolvidos com a maturação do ovócito, as elevadas taxas de polispermia, principal problema, durante a fertilização *in vitro* (FIV) e também sistemas inadequados para o desenvolvimento embrionário.

A necessidade de se encurtar a “lacuna” existente entre as condições de laboratório e as fisiológicas, como via para melhorar os resultados da PIV de embriões, é de grande importância. Esse descompasso entre as condições *in vivo* vs *in vitro* implica na realização de estudos sobre os meios de cultivo empregados, avaliando-se a possibilidade de formulação de novos meios em contrapartida com os disponíveis. Ademais, estudos do microambiente das células que participam dos momentos que antecedem a fecundação, tanto as células do epitélio tubárico quanto as células que rodeiam o ovócito, complexo de células do cumulus-*oophorus*, devem ser realizados.

As revisões sobre PIV de embriões na espécie suína nos últimos anos apontam a necessidade de se realizar novos estudos sobre as características dos processos de fecundação em si para resolver o persistente problema da polispermia, assim como melhorar os resultados do cultivo de embriões. Apesar

de todos os avanços e estudos realizados para melhorar o rendimento da PIV de embriões, ainda não está padronizado um procedimento e meios de cultivo nos quais os resultados possam ser repetitivos e obtidos de forma homogênea e consistente. Nesse contexto, a adição de hormônios aos meios de PIV de embriões pode ser uma alternativa importante no aprimoramento da técnica e obtenção de melhores resultados.

O fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) é um hormônio que comprovadamente desempenha importantes funções na reprodução, estando envolvido na maturação e fertilização do ovócito e também no desenvolvimento embrionário e fetal. Presente no ovário, é importante no estímulo ao crescimento e desenvolvimento dos ovócitos e folículos.

Alguns estudos tentam elucidar o papel do IGF-I na reprodução de fêmeas suínas, porém, poucos têm sido realizados pesquisando-se a importância desse hormônio nas várias etapas individuais da PIV de embriões suínos, como por exemplo, na maturação *in vitro* (MIV) e na FIV. Portanto, dado as funções que o IGF-I desempenha na reprodução, a determinação de níveis de IGF-I que possam ser acrescidos ao meio de MIV e/ou FIV que promovam uma maior taxa de penetração e melhores índices de fertilização, poderá ser útil para posteriores pesquisas que desenvolvam novos meios para a PIV de embriões. Associado a isso, o passo inicial deve ser a quantificação desse hormônio presente em condições fisiológicas nos folículos ovarianos, que são a fonte de ovócitos utilizados no emprego dessa tecnologia.

Dessa forma, o presente trabalho foi conduzido com os objetivos de (1) quantificar as concentrações fisiológicas de IGF-I livre no fluido folicular (FF) suíno utilizado para maturação *in vitro* de ovócitos coletado a partir de folículos de diferentes diâmetros e (2) avaliar os efeitos da adição de diferentes concentrações de IGF-I e FF obtido de folículos de dois diferentes diâmetros no meio de MIV sobre a progressão da maturação ovocitária e taxas de fertilização.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fertilização *in vitro* em suínos (FIV)

A FIV é definida como a união ou co-cultivo de espermatozoides capacitados e ovócitos maduros de forma que a penetração espermática tenha lugar fora do organismo materno (JIMÉNEZ et al., 2007; KOO et al., 2005). Esta técnica permite o estudo dos processos envolvidos na penetração do ovócito por um espermatozoide e a formação de um zigoto viável. É uma biotécnica em que todos os processos fisiológicos de maturação ovocitária, capacitação espermática, fecundação e desenvolvimento embrionário são realizados em laboratório (LASIENÉ et al., 2009; LONG; DOBRINSKY; JOHNSON, 1999).

A FIV é uma tecnologia utilizada para estudos dos inúmeros fatores relacionados com a fecundação, função espermática, maturação de ovócitos, sistemas de capacitação dos espermatozoides, mecanismos envolvidos na interação entre gametas e dos sinais que intervém no processo de desenvolvimento e diferenciação do embrião (COY; ROMAR, 2002; MATÁS et al., 2003). Além disso, outra importante aplicação da FIV é a avaliação da capacidade fecundante dos espermatozoides de reprodutores e sua correlação com as taxas de penetração e formação de pró-núcleos (GIL et al., 2008; LARSSON; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2000; WABERSKI et al., 2005). Portanto, é uma ferramenta adicional para a seleção de reprodutores em centrais de inseminação artificial (GADEA, 2005).

Na espécie suína, a FIV é aplicada na rotina científica para avaliar o potencial reprodutivo de machos (RUIZ-SÁNCHEZ et al., 2006), além de pesquisas relacionadas ao cultivo embrionário, transgênese e xenotransplantes (GARCÍA-VÁZQUEZ et al., 2010a, 2010b). A aplicabilidade dessa técnica

também é importante no melhoramento genético e recuperação de espécies ameaçadas de extinção (BAGG et al., 2004; COY; ROMAR, 2002).

Apesar de estes inúmeros temas de pesquisa relacionados à FIV em suínos atualmente realizados, a taxa de sucesso da técnica permanece baixa, dificultando assim os avanços nos referidos campos. Por exemplo, o primeiro suíno transgênico foi obtido em 1985 (HAMMER et al., 1985), porém poucas melhoras desde então foram obtidas, o que justifica a maioria das pesquisas se dedicam à obtenção de embriões viáveis a partir da FIV.

Um dos principais problemas enfrentados na FIV e PIV de embriões suínos é o alto índice de polispermia (JIMÉNEZ et al., 2007). Em função disso, pesquisas têm sido realizadas utilizando-se novas técnicas de MIV, preparação espermática, FIV e cultivo para que seja possível a posterior transferência de embriões (COY; ROMAR, 2002).

Dessa forma, é necessário que a metodologia da PIV de embriões seja simplificada, a fim de facilitar a sua execução e diminuir os efeitos das particularidades inerentes a cada macho, como a relação espermatozoide:ovócito, para a obtenção de melhores índices de taxa de formação de pró-núcleos e a concentração espermática utilizada (JIMÉNEZ et al., 2007). Além disso, é preciso melhorar os fatores inerentes ao processo de maturação ovocitária que influenciam diretamente na formação dos pró-núcleos e, conseqüentemente, no resultado da técnica (ZHANG et al., 2012).

2.2 Polispermia

A fertilização monospérmica é um passo essencial para o processo reprodutivo em suínos (XIA et al., 2001) e em outras espécies, sendo o bloqueio da entrada de mais de um espermatozoide indispensável para o sucesso da fecundação e sobrevivência embrionária nessa espécie (COY; AVILÉS, 2010).

De acordo com Coy et al. (2008a), o desenvolvimento de um futuro embrião depende da capacidade do ovócito proteger a si mesmo contra um excesso de espermatozoides e a invasão de potenciais microorganismos patogênicos ou parasitas.

A polispermia, por outro lado, pode ser definida como a penetração de mais de um espermatozoide dentro do ovócito durante o processo de fecundação (BIJTTEBIER et al., 2008; WANG; DAY; WU, 2003) e geralmente é considerado um fenômeno patológico nos mamíferos (XIA et al., 2001). Na FIV, esse acontecimento é observado por meio da presença de mais de dois pró-núcleos no interior do ovócito ou a presença de vários espermatozoides penetrados (OBERLENDER et al., 2012) (Figura 1).

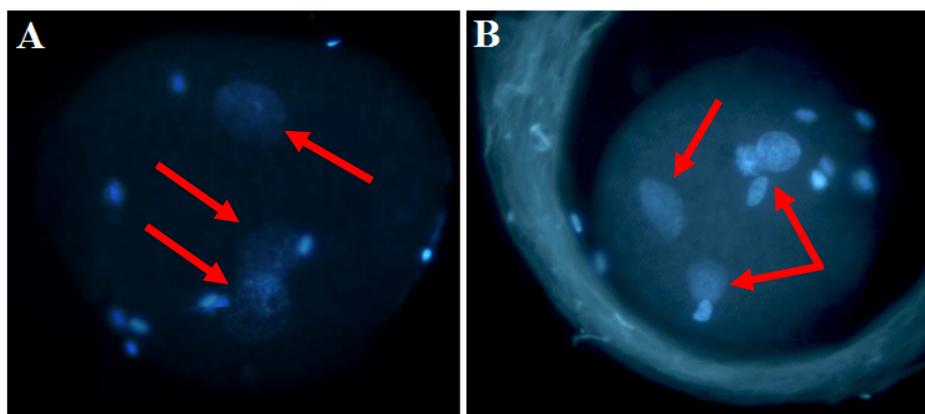


Figura 1 Ovócitos suínos polispérmicos. A) Ovócito penetrado por dois espermatozoides, sendo visualizados três pró-núcleos (setas), sendo um feminino e dois masculinos. B) Ovócito penetrado por inúmeros espermatozoides, sendo possível visualizar vários pró-núcleos e espermatozoides em descondensação (setas)

Fonte: Arquivo pessoal

A fertilização polispérmica gera um desenvolvimento anormal do zigoto e a morte embrionária recente ou posterior aborto espontâneo (COY; AVILÉS, 2010). Se ocorrer o nascimento em mamíferos a partir de um embrião

polispérmico, esse irá apresentar graves e múltiplas anormalidades (NOLTING et al., 2002). A sua ocorrência em mamíferos domésticos é pouco frequente, sendo observada de maneira fisiológica em outras espécies, por exemplo, nas aves (COY; ROMAR, 2002).

Em suínos, a polispermia tanto *in vivo* quanto *in vitro*, ocorre frequentemente em comparação às demais espécies. Esse acontecimento depende de diversos fatores, tais como o ambiente da fecundação, a má qualidade dos espermatozoides e ovócitos e o número de sítios de fertilização. Por ocorrer de maneira frequente, a espécie suína é considerada modelo de estudo dessa patologia (COY et al., 2008a). Ressalta-se que em condições fisiológicas a sua ocorrência não afeta os índices de nascimento (FAUSTINI et al., 2010).

A polispermia é um problema persistente durante a PIV de embriões suínos (COY; ROMAR, 2002; ZHANG et al., 2012). Os elevados índices que ocorrem nessa espécie limitam a obtenção de embriões para o uso em áreas de pesquisa aplicadas à produção de animais transgênicos para xenotransplantes, obtenção de células-tronco, pesquisas relacionadas à terapia gênica, transferências nucleares e biomedicina experimental.

Sua incidência *in vivo* pode ser menor que 5% (FUNAHASHI; EKWALL; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000). Entretanto, *in vitro*, Wu et al. (2004) encontraram porcentagens de polispermia maiores que 65% do total de ovócitos maturados e penetrados. De acordo com Coy e Romar (2002), a polispermia *in vitro* pode chegar a alcançar taxas que variam de 40 a 60%, quando a porcentagem de ovócitos penetrados esteja próxima aos 100%. Já com o uso de ovócitos obtidos a partir de lavagens das tubas uterinas, o índice de polispermia na FIV foi de 28%. De fato, elevados índices de polispermia ocorrem durante a FIV quando comparado à fertilização *in vivo* (COY; AVILÉS, 2010) e também quando comparado com outras espécies, como por exemplo, a

bovina, em que os índices de polispermia não ultrapassam 10% (KAWARSKY et al., 1996).

Essa patologia *in vivo* pode alcançar taxas de 30 a 40%, sendo que não se sabe até que ponto este acontecimento pode ser considerado uma condição fisiológica para a espécie suína e se os ovócitos suínos possuem algum mecanismo para remover os espermatozoides em excesso no citoplasma (XIA et al., 2001). Já foi proposto que a polispermia pudesse ser um processo fisiológico em suínos e que os ovócitos apresentam algum mecanismo pelo qual eliminariam os espermatozoides excedentes no ooplasma (HAN et al., 1999; XIA et al., 2001). Contudo, a entrada de mais de um espermatozoide no ooplasma é letal para o desenvolvimento embrionário e o bloqueio da polispermia na espécie suína é mais complexo, ou ineficiente, em comparação com outras espécies.

O bloqueio da polispermia em suínos está localizado na zona pelúcida (ZP) e na membrana plasmática do ovócito (XIA et al., 2001). Além disso, diferentes regiões do trato genital feminino, particularmente a tuba uterina, também ajudam o ovócito a se proteger do excesso de espermatozoides (COY; AVILÉS, 2010).

A ocorrência da polispermia na FIV é devida a diversos fatores, como a fertilização de ovócitos imaturos, a fertilização de ovócitos velhos em processo de degeneração, anormalidades durante a reação da ZP e na própria estrutura da ZP, e o elevado número de espermatozoides capacitados em contato com o ovócito (WANG; DAY; WU, 2003). Um sistema ideal de FIV de suínos deve ter taxa de penetração maior 80% e incidência de polispermia menor que 10% (ABEYDEERA, 2002). Portanto, é possível verificar a importância que tal fato representa para o processo como um todo e a necessidade de melhoras no processo de PIV para a obtenção desses resultados.

Inúmeras pesquisas têm sido realizadas com objetivo de diminuir as elevadas taxas de polispermia obtidas durante a FIV em suínos. Esses estudos envolvem a utilização de diferentes meios de manipulação e cultivo e a modificação destes (COY et al., 1999; FAUSTINI et al., 2010), utilização de diferentes concentrações espermáticas – relação espermatozoide:ovócito (COY et al., 1993; GIL et al., 2004) e a realização da FIV com diferentes tempos de co-cultivo dos espermatozoides com os ovócitos (ABEYDEERA; DAY, 1997). Porém, até o momento pouco sucesso tem sido obtido (ZHANG et al., 2012).

2.2.1 Fertilização de ovócitos imaturos

A fertilização de ovócitos imaturos está relacionada com elevados índices de polispermia. Em suínos, esses ovócitos aumentam em 10 vezes a incidência de penetrações polispérmicas e diminuem em até 10% a fecundação monospérmica (COY; AVILÉS, 2010; WANG; DAY; WU, 2003). Isso ocorre em função de uma reação cortical menos eficiente do que em condições naturais. Essa reação ocorre devido a insuficiente liberação do conteúdo dos grânulos corticais (GC), ao número inadequado dessas organelas no córtex ovocitário e também a errônea distribuição dos grânulos ao redor do ovócito (ROMAR et al., 2005). Com isso, a liberação dos grânulos após a penetração espermática não é suficiente para que ocorra a reação cortical e conseqüente bloqueio da entrada de mais espermatozoides (BUREAU; BAILEY; SIRARD, 2000; FUNAHASHI; EKWALL; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000).

Os ovócitos imaturos possuem uma incompleta ativação após a penetração espermática, sendo esse fenômeno explicado por algumas hipóteses (ASANO; NIWA, 2004). A primeira hipótese é o baixo trânsito de cálcio nos ovócitos imaturos, após a penetração espermática, quando comparado com ovócitos maduros. A menor entrada de cálcio no ovócito resulta em baixa

formação do segundo mensageiro 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3). Além disso, ovócitos imaturos não são sensíveis à estimulação de ativação pelos aumentos das concentrações de cálcio intracelular (WANG; DAY; WU, 2003).

A segunda hipótese é a incompleta migração dos GC para a periferia dos ovócitos (KIM et al., 1997b). Essa migração é fundamental para uma eficiente liberação dos mesmos após a penetração espermática (NAGAI, 1996). A terceira hipótese é o menor retículo endoplasmático cortical, que durante o processo de maturação, principalmente na fase final, não apresenta aumento em número. Os retículos endoplasmáticos são os principais reservatórios intracelulares de cálcio (ABEYDEERA; DAY, 1997), portanto, menor quantidade de retículos endoplasmáticos corticais, reduz a concentração de íons cálcio. Ovócitos imaturos também possuem reduzidas reservas de cálcio no interior dos poucos retículos endoplasmáticos. Com isso é mais susceptível não só a falhas no processo de ativação após a penetração como também no controle da polispermia (WANG; DAY; WU, 2003).

A quarta hipótese baseia-se no menor número de receptores ovocitários para IP3 presentes no córtex dos ovócitos imaturos. Durante o período final de maturação, os receptores de IP3 estão significativamente aumentados e, como os ovócitos imaturos possuem poucos receptores para este segundo mensageiro, estes são incapazes de responder adequadamente ao processo de ativação e posterior bloqueio da polispermia (WANG; DAY; WU, 2003).

Dessa forma, várias mudanças ocorrem durante os processos de maturação do ovócito, principalmente nas etapas finais. A maturação inclui o desenvolvimento da habilidade do ovócito ser ativado e de sua capacidade de impedir a ocorrência da polispermia (COY; AVILÉS, 2010).

2.2.2 Fertilização de ovócitos velhos

A idade dos ovócitos é um fator que contribui para a ocorrência da polispermia e também das baixas taxas de penetração espermática e eficiência da FIV (COY; ROMAR, 2002), pois o tempo de vida funcional para que o ovócito bloqueie a penetração de mais de um espermatozoide é muito pequeno (WANG; DAY; WU, 2003). Portanto, elevada incidência de polispermia ocorre em grande parte dos ovócitos fertilizados após longo tempo de ovulação/maturação, sendo estes achados observados tanto *in vivo* como durante a FIV (ABEYDEERA, 2002).

Vários fatores estão associados à incapacidade dos ovócitos velhos em bloquear a penetração polispérmica, sendo as alterações nos GC as que melhor as explica. De acordo com Long, Dobrinsky e Johnson (1999), com o passar do tempo, a monocamada dos grânulos passa a ser descontínua devido a uma degradação dos mesmos. Assim, várias teorias são propostas para a ineficiência por parte dos ovócitos velhos em bloquear a polispermia, sendo: excitose prematura, parcial e espontânea dos GC (KIM et al., 1997b; XU et al., 1997) e a redução da densidade dos grânulos e das enzimas presentes nos mesmos (WANG; DAY; WU, 2003). Além disso, com o passar da idade, a degeneração do citoplasma do ovócito faz com que todas as funções associadas à ativação e ao bloqueio da polispermia sejam afetadas, logo, a reação cortical não ocorre de maneira correta. Ovócitos velhos, quando fertilizados normalmente, apresentam seu desenvolvimento posterior significativamente comprometido, indicando que todas as funções celulares são afetadas com o passar da idade (WU et al., 2004).

2.2.3 Bloqueio da polispermia pela zona pelúcida

A ZP desempenha importante papel no controle da polispermia por ser uma barreira espécie-específica contra a penetração excessiva de espermatozoides (BIJTTEBIER et al., 2008; COY et al., 2008a). Está envolvida na ligação espermatozoide-ovócito (ROMAR et al., 2005), sendo o reconhecimento e ligação mediados por um acoplamento de carboidratos presentes nas glicoproteínas de superfície específicas da ZP e proteínas presentes na membrana espermática (COY; AVILÉS, 2010).

O mecanismo pelo qual a ZP bloqueia a polispermia ainda não está completamente elucidado. Sabe-se que extensas modificações ocorrem nos conteúdos das substâncias presentes na ZP e nos GC durante a ativação do ovócito no momento da fertilização. Isso induz alterações na estrutura da ZP levando ao seu endurecimento (“*hardening*”), impedindo assim a penetração de espermatozoides extras (COY et al., 2008a ; WANG; DAY; WU, 2003).

O endurecimento da ZP *in vivo* ocorre naturalmente após a fertilização, sendo esse processo resultado da exocitose dos GC presentes na superfície do ovócito, liberando assim as enzimas ali presentes (por exemplo, ovoperoxidase, enzimas tipo tripsina, proteinases e N-acetilglicosaminidase) para o espaço perivitelínico (EPV) (BUREAU; BAILEY; SIRARD, 2000; FUNAHASHI; EKWALL; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000). Esse fato impede a passagem de espermatozoides extras capacitados por aumentar a resistência da ZP à digestão proteolítica pelas enzimas presentes no acrossoma (XIA et al., 2001). Essa resistência ocorre devido à internalização e/ou mudança de conformação dos sítios de ligação dos espermatozoides na ZP, induzindo assim ligações cruzadas entre as próprias proteínas da ZP, levando a não ocorrência da ligação de demais espermatozoides aos receptores (COY et al., 2008a). Portanto, a ocorrência da

polispermia na FIV em suínos pode estar relacionada à incompleta ou à ausência da reação da ZP à penetração de um espermatozoide (COY; ROMAR, 2002).

2.2.4 Número de espermatozoides

Em condições fisiológicas, o istmo regula o número de espermatozoides disponíveis no local da fecundação por atuar como um reservatório espermático (DUBUC; SIRARD, 1996), evitando e/ou diminuindo a ocorrência da polispermia (WANG; DAY; WU, 2003). O trato genital feminino limita e bloqueia a chegada de espermatozoides no local da fecundação em uma ordem que se mantêm de mais ou menos 1:1 (espermatozóide:ovócito) (BUREAU; BAILEY; SIRARD, 2000). Portanto, aumentos das taxas de polispermia *in vivo* ocorrem primariamente devido ao anormal e elevado número de espermatozoides competentes e capacitados que entram em contato com a superfície do ovócito. De acordo com Mugnier et al. (2009) quanto mais espermatozoides adequadamente capacitados forem depositados no sítio de fecundação, mais ovócitos serão penetrados por mais de um espermatozoide.

Ovócitos maturados *in vitro* são expostos a um excessivo número de espermatozoides por um longo período de tempo para que ocorra a fecundação. Estas condições são alguns dos principais fatores que predispõem os ovócitos a penetração polispérmica (ABEYDEERA, 2002).

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que o número de espermatozoides no local de fecundação está diretamente relacionado com as taxas de polispermia (SOMFAI et al., 2008). Abeydeera e Day (1997) demonstraram que as taxas de fertilização polispérmica foram aumentadas quando houve um aumento do número de espermatozoides capacitados em contato com o ovócito. Faustini et al. (2010) obtiveram expressiva correlação entre o número absoluto de espermatozoides por ovócito durante a fertilização e o grau de polispermia.

Assim, uma solução simples e prática seria a redução do número de espermatozoides utilizados por ovócito durante a fertilização, mas na maioria desses casos são baixas as taxas de penetração (ABEYDEERA, 2002). Portanto, não está completamente esclarecido porque uma alta concentração de espermatozoides é necessária para obtenção de índices satisfatórios de fertilização e penetração *in vitro* (WANG; DAY; WU, 2003).

Provavelmente, as condições de capacitação são subótimas quando comparado à mesma situação *in vivo*, e isso faz com que no momento da fecundação esteja presente grande quantidade de espermatozoides capacitados e não capacitados. Consequentemente há ocorrência de reação acrossômica espontânea antes dos espermatozoides entrarem em contato com o ovócito (SOMFAI et al., 2008). Portanto, a disponibilidade de espermatozoides adequadamente capacitados na FIV pode ajudar no bloqueio da polispermia (SUZUKI et al., 2003).

Protocolos de seleção espermática na FIV são utilizados na tentativa de se remover espermatozoides inviáveis e manter apenas espermatozoides viáveis e com maior sobrevivência (BUREAU; BAILEY; SIRARD, 2000; COY; ROMAR, 2002). Essa seleção é importante no que se refere ao número de espermatozoides viáveis a serem utilizados, pois, se o método for suficientemente eficiente, consegue-se uma melhor separação de espermatozoides com maior capacidade fecundante. Com isso, um menor número de espermatozoides pode ser utilizado na FIV e consequentemente uma melhora nos resultados de polispermia pode ser obtida (NAGAI, 1996).

2.2.5 Papel das células e secreções da tuba uterina em bloquear a polispermia

As células do epitélio tubárico e suas secreções são importantes para a fertilização, além de controlar em parte a ocorrência da polispermia (DUBUC; SIRARD, 1996). De acordo com Wang, Day e Wu (2003), antes da fecundação, os espermatozoides permanecem parados no istmo, os quais apresentam-se ligados, promovendo assim uma seleção de células que entram em contato com o ovócito no sítio de fecundação (BUREAU; BAILEY; SIRARD, 2000). Quando em contato com as células da tuba uterina, os espermatozoides têm sua motilidade diminuída (permanecem quiescentes) e o processo de reação acrossômica inibido, sendo que apenas poucas centenas são capazes de chegar sem danos ao sítio de fecundação (KIDSON et al., 2003; ROMAR et al., 2001). Portanto, apenas espermatozoides adequadamente capacitados conseguem chegar ao local da fecundação.

Além das características das células da tuba uterina, as interações entre os ovócitos e as secreções tubáricas auxiliam no bloqueio da penetração polispérmica (PARK; SIRARD, 1996). Esse auxílio se deve ao endurecimento da ZP provocada por essas secreções, o que favorece a monospermia (COY et al., 2008b).

A tuba uterina, sob estímulo dos hormônios esteróides ovarianos, é responsável pela síntese e secreção de proteínas, glicoproteínas e produção de um transudado seroso diferenciado secretado no lúmen (KOUBA et al., 2000), que se liga aos espermatozoides, reduzindo a ocorrência da polispermia (KIDSON et al., 2003). Essas moléculas também afetam a membrana plasmática do espermatozoide, estabilizando-a e reduzindo o número de espermatozóides capacitados simultaneamente (WANG; DAY; WU, 2003). Dessa forma, há uma

redução do número de espermatozoides que entram em contato com o ovócito e uma menor probabilidade de ocorrência de penetrações polispérmicas.

Dentre as proteínas, a glicoproteína específica da tuba uterina (GETU) e a ovidutina são importantes para a regulação da ligação dos espermatozoides à ZP dos ovócitos (KOUBA et al., 2000; MCCAULEY et al., 2003) e a GETU tem sido identificada em diversas espécies, incluindo nos suínos. É secretada pela tuba uterina sendo dependente de altas concentrações de estrogênio (MCCAULEY et al., 2003). Por estar ligada à zona ZP, no EPV, na membrana plasmática de ovócitos e em embriões coletados da tuba uterina, sugere-se que essa desempenha importante papel na regulação da fertilização, principalmente no controle da ligação-penetração espermática. Por outro lado, a glicoproteína ovidutina (COY et al., 2008b) presente no fluido tubárico pode entrar no EPV ou na membrana plasmática ovocitária e facilitar o sincronismo na exocitose dos GC e promover adequada reação da ZP, por aumentar a sensibilidade aos mesmos.

2.3 Características morfológicas dos ovócitos maduros

Ovócitos maduros de fêmeas suínas são considerados umas das maiores células do organismo, podendo chegar a um diâmetro de 120 μm em folículos antrais (MORBECK et al., 1992).

O ovócito é uma célula que se apresenta circundada por uma matriz extracelular transparente denominada ZP (FAMILIARI et al., 2006; MICHELMANN et al., 2007). Em suínos, a ZP é composta por quatro glicoproteínas: pZP1, pZP2, pZP3 e pZP3 α (também chamada de pZP4) (ANTOSIK et al., 2010; RATH et al., 2006). A ZP rodeia o ooplasma do ovócito que possui a sua própria membrana celular (oolema). Entre o oolema e a ZP existe um espaço virtual chamado de EPV, no qual está localizado o primeiro

corpúsculo polar do ovócito em metáfase II (Figura 2). Cada uma dessas estruturas do ovócito apresenta uma função fundamental durante a fecundação e posterior desenvolvimento embrionário.

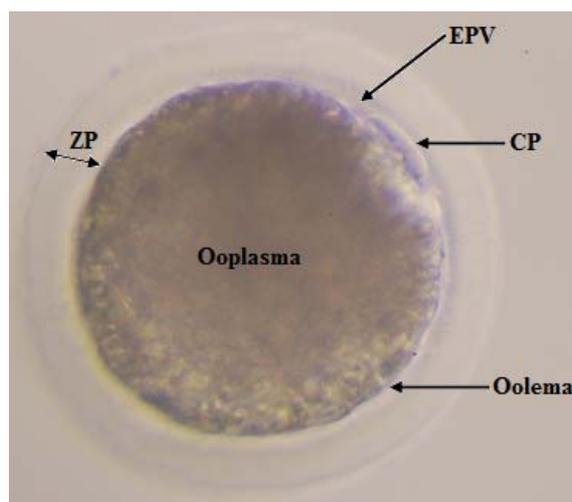


Figura 2 Descrição esquemática de um ovócito suíno maturado *in vitro* (ZP: zona pelúcida; EPV: espaço perivitelínico; CP: corpúsculo polar) (aumento de 400×)

Fonte: Arquivo pessoal

A ZP possui funções importantes durante a oogênese, fecundação e pré-implantação embrionária (FAMILIARI et al., 2006). Em suínos, a ZP apresenta largura de 16 μm e um conteúdo de 30 a 33 ng de glicoproteínas (NAKANO; YONEZAWA, 2001). É composta por aproximadamente 19% de carboidratos e 17% de proteínas em forma de glicoproteínas completas (ROMAR et al., 2005). Durante a fecundação, a ZP regula a união dos espermatozoides ao ovócito, promovendo assim a reação acrossômica (MUGNIER et al., 2009; WASSARMAN et al., 2005). Após a fecundação, por ação do conteúdo dos GC liberados após a ativação dos ovócitos, a ZP apresenta mudanças nas glicoproteínas e com isso, há uma inibição da penetração por mais de um

espermatozoide (WANG; DAY; WU, 2003). Por exemplo, em ovócitos suínos, a glicoproteína pZP2 (90 kDa) se rompe de forma específica em fragmentos de 65 kDa e 25 kDa aproximadamente (HATANAKA et al., 1992) impedindo assim a ligação e penetração de excessivos espermatozoides.

Quando os ovócitos entram em contato com as células do epitélio tubárico, a ZP aumenta a sua resistência à proteólise por meio do seu endurecimento (COY et al., 2008a; MCCAULEY et al., 2003). Esse endurecimento é promovido pela glicoproteína ovidutina, sintetizada e secretada de forma específica em diferentes fases do ciclo estral (COY et al., 2008b), e que contribui para a regulação da ocorrência da polispermia.

Entre a ZP e oolema há um espaço virtual denominado EPV. Este se assemelha a uma matriz extracelular que é formada durante a ovogênese. De acordo com Talbot e Dandekar (2003), o termo espaço é incorreto, uma vez que implica em algo vazio. Na verdade, o EPV apresenta inúmeros conteúdos que mudam durante o desenvolvimento do ovócito e que apresentam vários papéis antes, durante e depois da fecundação. O tamanho do EPV varia consideravelmente durante todo o desenvolvimento ovocitário. Apresenta-se pequeno e de difícil visualização quando o ovócito está na fase de vesícula germinativa e, por outro lado, na fecundação, demonstra tamanho ampliado e assimétrico ao redor dos corpúsculos polares (YOU et al., 2010).

O EPV contém uma matriz rica em ácido hialurônico e outros componentes que são filtrados através da ZP, como o fluido do antro folicular e proteínas produzidas pelas células da granulosa ao redor do ovócito (TALBOT; DANDEKAR, 2003). O conteúdo do EPV é modificado após a passagem do ovócito pelas células da tuba uterina, quando a ZP é banhada pelo fluido tubárico. Com essa passagem, ocorre a incorporação da glicoproteína ovidutina na ZP e no EPV antes da fecundação (BUHI; ALVAREZ; KOUBA, 2000; BUHI, 2002). Durante a fecundação, o conteúdo do EPV também se modifica

pela ação da excitose dos GC que liberam as proteínas contidas nessas organelas no EPV, assim, há um aumento significativo em seu tamanho (TALBOT; DANDEKAR, 2003). De acordo com o mesmo autor, o ácido hialurônico, ovidutina e proteínas dos GC, são descritas como moléculas reguladoras da polispermia. Portanto, sugere-se que o EPV apresenta um importante papel durante a fecundação, principalmente na regulação desse evento maléfico para o desenvolvimento embrionário.

O oolema é a membrana plasmática do ovócito. É semelhante à membrana plasmática das células somáticas, sendo formado por fosfolípidios, colesterol e proteínas (integrals e periféricas). É uma estrutura que engloba toda a célula, define os seus limites e contribui para a manutenção do equilíbrio entre o interior e o exterior da mesma (CALVERT et al., 2003). Apresenta em sua superfície inúmeras proteínas, entre elas as proteínas ligadas ao glicosilfosfatidilinositol (P-GPI), tetraspaninas e as integrinas, responsáveis pelo reconhecimento do espermatozoide durante o momento de fusão e controle da polispermia (ALFIERI et al., 2003; ETO et al., 2002; HEMLER, 2005).

O ooplasma do ovócito maduro contém diferentes organelas, incluindo aquelas presentes na maioria das células somáticas (SATHANANTHAN et al., 2006). Nos ovócitos suínos, o núcleo é a maior organela, seguido pelas gotas lipídicas que representam aproximadamente 20% do volume celular. As mitocôndrias, também abundantes no ovócito, são morfologicamente esféricas ou ovaladas e possuem densas matrizes e poucas cisternas (BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA, 2006). O retículo endoplasmático liso apresenta-se em duas formas nos ovócitos, uma formando vesículas e outra pequenas agregações tubulares. Também estão presentes os lisossomas, que apresentam uma grande variedade de formas dependendo do estágio de maturação do ovócito. O oolema é uma matriz clara, de textura granular, na qual estão contidas as organelas celulares. O retículo endoplasmático rugoso está presente apenas no ovócito em

metáfase II. O aparelho de Golgi está ausente nos ovócitos maduros, enquanto no estágio de vesícula germinativa sua função é a síntese de GC (BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA, 2006).

2.4 Sistema fator de crescimento semelhante à insulina (Sistema IGF)

O sistema IGF tem como principal função integrar o crescimento, diferenciação, reparação, sobrevivência e o metabolismo de múltiplas células e tecidos normais (CHAVES; WASIF SAIF, 2011; HIGASHI et al., 2012; LACKEY; GRAY; HENRICKS, 1999). Entretanto, tem-se sugerido que esse sistema possa também estar envolvido em doenças comuns como a aterosclerose, diabetes e neoplasias (CHAVES; WASIF SAIF, 2011; CLEMMONS et al., 2011; HIGASHI et al., 2012).

Os componentes estabelecidos do sistema IGF são os IGF-I e IGF-II, os receptores tipo I (IGF-IR) e II (IGF-IIR), as seis proteínas de ligação aos IGFs (IGFBPs-1 a -6) e as proteases das IGFBPs (FRYSTYK, 2004; HWA; OH; ROSENFELD, 1999) (Figura 3). Em peixes teleósteos (Tilápias, *Oreochromis niloticus* e Zebrafish, *Danio rerio*) foi demonstrada a existência de um terceiro ligante, denominado IGF-3, localizado apenas nas gônadas, estando ausente no genoma de outros vertebrados (REINECKE, 2010; WANG et al., 2008).

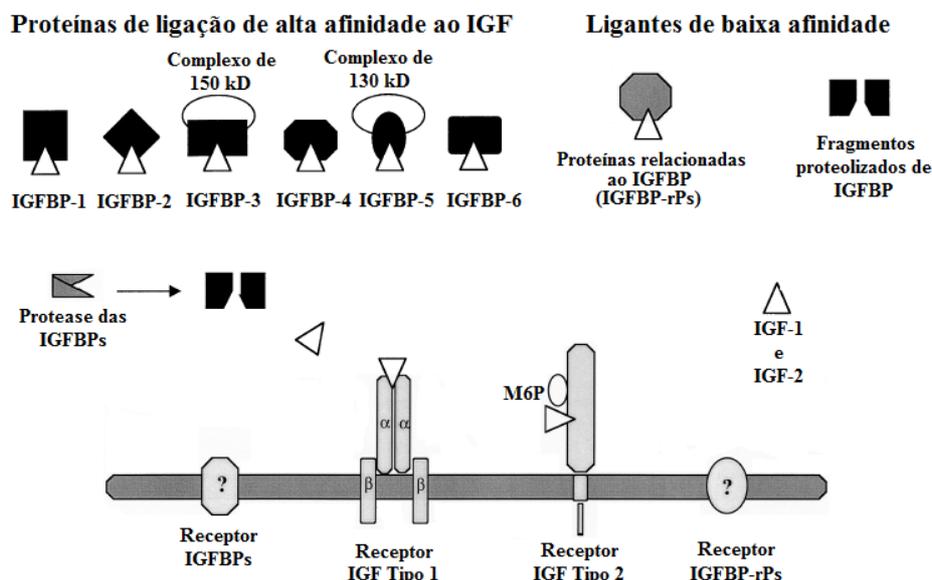


Figura 3 O sistema IGF. Os componentes incluem os peptídeos IGF-I e IGF-II, IGFBP-1 a -6, IGFBP-rPs, protease das IGFBPs, receptores do IGF-I e -II e potenciais receptores IGFBPs e IGFBP-rPs. M6P, Manose-6-fosfato
 Fonte: Adaptado de Hwa, Oh e Rosenfeld (1999)

2.4.1 Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I e II

O IGF-I e IGF-II são peptídeos promotores do crescimento, membros de uma superfamília de hormônios relacionados com a insulina (RUSSO et al., 2005). Ambos estão intimamente relacionados à insulina em termos de sequência primária da molécula e atividade biológica, e possuem uma homologia de 70% dos aminoácidos entre eles. Os IGFs consistem nos domínios A, B, C e D, sendo que grande parte da sequência, dentro dos domínios A e B, são homólogas às cadeias α - e β - da proinsulina. Essa sequência de homologia é de 43% para o IGF-I e 41% para o IGF-II (SPICER; ECHTERNKAMP, 1995). A sequência de aminoácidos dos IGFs é altamente conservada entre as espécies (ODLE; ZIJLSTRA; DONOVAN, 1996; SPICER; ECHTERNKAMP, 1996) (Tabela 1).

Tabela 1. Homologia do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) e II (IGF-II) entre várias espécies

IGFs Suíno	Humano	Bovino	Rato	Ovino
IGF-I	100	100	96	99
IGF-II	99	97	96	98

Fonte: Adaptado de Spicer e Echterkamp (1996).

O IGF-I é formado por 70 aminoácidos (cadeia polipeptídica simples) possuindo aproximadamente 7,47 kDa de massa molecular (BUNN; FOWLKES, 2003; CHAVES; WASIF SAIF, 2011). O fígado é o sítio de produção primária do IGF-I, entretanto, a maioria dos tecidos é capaz de produzir (FRYSTYK, 2004). Estudos *in vivo* sugerem que a produção parácrina e autócrina de IGF-I é mais importante para o crescimento corporal total, do que a produção endócrina do hormônio circulante pelo fígado (OHLSSON et al., 2009; STRATIKOPOULOS et al., 2008; YAKAR et al., 1999).

De acordo com Rosendal et al. (2002), o IGF-I exerce efeitos semelhantes aos da insulina sobre o crescimento. Esse hormônio recebeu a denominação de IGF-I devido ao termo inglês “*Insulin-Like Growth Factor-I*”, sendo também conhecido como Somatomedina C.

O IGF-I foi primeiramente identificado em 1957 (SALMON; DAUGHADAY, 1957), quando foi isolado do soro e observada a sua capacidade de mediar o efeito do hormônio do crescimento (GH) no processo de sulfatação da cartilagem, bem como no processo de crescimento ósseo longitudinal. Desta forma, foi nomeado de fator de sulfatação (RUSSO et al., 2005).

Dulak e Termin em 1973 ao estudarem fatores de crescimento presentes no soro, conseguiram identificar um que apresentava atividade estimulatória múltipla. A princípio foi considerado como sendo a insulina, por estar presente

no soro e por ser uma molécula que poderia estar mediando esses efeitos observados. Porém, ao se realizar o tratamento do soro com anticorpos anti-insulina o efeito anteriormente observado não foi desconsiderado, indicando assim tratar-se de outra molécula. A partir desse momento, esse fator passou a se chamar Fator Cujá Atividade não é Inibida por Anticorpos Anti-Insulina (NSILA) e, posteriormente renomeado para Somatomedina C, pois foi observado que esse fator mediava as ações do GH em várias células e tecidos. Alguns anos depois, demonstrou-se a semelhança estrutural entre a cadeia β desse fator com a próinsulina, e passou a ser chamado de Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo I (RUSSO et al., 2005).

2.4.2 Receptor do IGF-I (IGF-IR) e suas funções

A maioria das ações biológicas dos IGFs é mediada pelo receptor de IGF-I (IGF-IR) (VINCENT; FELDMAN, 2002), que é uma glicoproteína de superfície celular que transmite a ligação do IGF a um sistema de sinalização intracelular altamente integrado (KIM; VAN GOLEN; FELDMAN, 2004).

O IGF-IR é um receptor transmembrana tetramérico do tipo tirosina quinase que apresenta elevada homologia com o receptor da insulina (RUSSO et al., 2005). É composto por duas subunidades extracelulares α (130 a 140 kDa) e dois domínios transmembrana e intracelulares β (90 a 98 kDa) unidos por ligações dissulfeto (SILVA; FIGUEIREDO; VAN DEN HURK, 2009) (Figura 4). A afinidade desse receptor para o IGF-I é maior do que para o IGF-II e bem mais elevada para com a insulina.

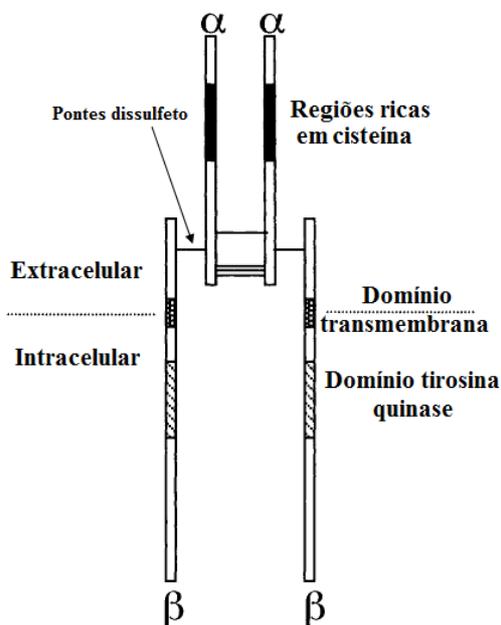


Figura 4. Estrutura do receptor de IGF-I (IGF-IR). O IGF-IR é um membro dos receptores tirosina quinase, contendo múltiplos sítios intracelulares de fosforilação

Fonte: Adaptado de Vincent e Feldman (2002)

A ligação dos IGFs (I e II) ao IGF-IR promove uma atividade intracelular tirosina quinase intrínseca que fosforila os substratos do receptor de insulina (IRS-1 a IRS-4), chamada de “auto-fosforilação incestuosa” (HIGASHI et al., 2012). Em seguida, leva a ativação de duas principais cascatas de sinalização, a cascata da via da fosforilação Ras/Raf e ativação da MAPK (Proteína quinase ativada por mitógenos) que induz a uma proliferação e crescimento celular e a cascata do fosfatidil-inositol 3-quinase (PI3K) e Akt/BAD que induz a inibição de sinais pró-apoptóticos (CHAKRAVARTHY et al., 2000; CHAVES; WASIF SAIF, 2011; RUSSO et al., 2005) (Figura 5).

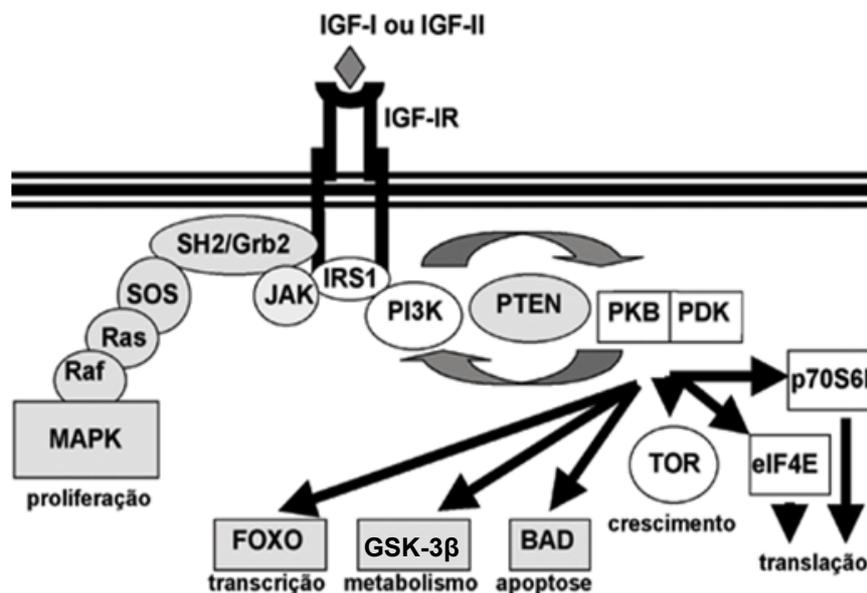


Figura 5 Representação simplificada dos componentes intracelulares do sistema IGF-I e suas ações após a ativação do IGF-IR pelo IGFs (I e II)

Fonte: Adaptado de Spinola e Castro e Guerra-Júnior (2005)

2.4.3 Proteínas de ligação aos IGFs (IGFBPs)

A interação dos IGFs com o seu receptor é regulada pelas IGFBPs (BUNN; FOWLKES, 2003). Trata-se de um grupo de proteínas solúveis que possuem alta afinidade de ligação aos IGFs (CHAVES; WASIF SAIF, 2011), sendo que aproximadamente 90% de todo o IGF-I se encontra ligado a proteínas transportadoras (LEE et al., 2004; MACHADO, 2007). Existem seis dessas proteínas já purificadas e com os genes codificados (IGFBP-1 a IGFBP-6) (FIRTH; BAXTER, 2002). As IGFBPs estão presentes em todos os fluidos biológicos e podem ser classificadas em dois grupos: (1) IGFBP-1, -2, -4, -5 e -6 (24 a 35 kDa) e (2) IGFBP-3, que é a mais predominante no soro (SILVA; FIGUEIREDO; VAN DEN HURK, 2009). Nesse fluido, a IGFBP-3 apresenta-se predominantemente na forma de 150 kDa, composta pelo IGF-I ou IGF-II e

uma subunidade ácido-lábil (SAL) rica em leucina de 85 kDa, que é responsável pelo prolongamento do período de meia-vida do IGF-I. A IGFBP-3 é responsável por 75% ou mais do transporte dos IGFs no soro (FIRTH; BAXTER, 2002).

A ligação dos IGFs à SAL é restrita na corrente sanguínea, sendo produzida no fígado. O IGF-I, como um complexo com a IGFBP-3, pode atravessar o endotélio capilar. Assim, a formação e dissociação do complexo ternário (IGF-I, IGFBP-3 e SAL) são importantes para a regulação e a disponibilidade de IGF-I (DAI; BAXTER, 1994; HOLMAN; BAXTER, 1996). As demais IGFBPs (IGFBP-1, -2, -4, -5 e -6) podem potencializar ou inibir a atividade do IGF-I. As IGFBPs podem não agir meramente como transportadoras dos IGFs, mas conferem aos mesmos funcionalidade e especificidade nos tecidos-alvo, pois influenciam diretamente na ligação e na interação com receptores específicos (FIRTH; BAXTER, 2002).

Além das seis IGFBPs, pesquisas demonstram a existência de IGFBPs-relacionadas (IGFBP-rPs). São grupos de proteínas com semelhança estrutural e funcional com as IGFBPs (HWA; OH; ROSENFELD, 1999; KIM et al., 1997a; OH et al., 1996).

A família das IGFBPs coordena e regula a atividade biológica dos IGFs por várias maneiras, dentre elas, as quatro essenciais são: a) transporte de IGF no plasma e controle da sua difusão e efluxo para o espaço vascular; b) aumento do tempo de meia vida e regulação do *clearance* dos IGFs; c) proporcionam sítios de ligação para os IGFs no espaço extracelular e pericelular e d) modulam, inibem ou facilitam a interação dos IGFs com seus receptores (FIRTH; BAXTER, 2002; RUSSO et al., 2005). Portanto, as IGFBPs, além de estabilizarem e regularem os níveis de IGFs, também regulam a resposta celular por facilitar a ligação do IGF-I ao seu receptor ou por modular a disponibilidade de IGF-I no espaço pericelular.

Todas as IGFBPs apresentam afinidade similar ou superior para o IGF-I e IGF-II do que para o IGF-IR, sendo que se ligam aos IGFs através de seus domínios C-terminal e N-terminal (HWA; OH; ROSENFELD, 1999). Isso sugere que a formação de complexos IGF-IGFBP é favorecida em relação à formação de IGF-IGF-IR, o que impediria a sinalização através do IGF-IR (BUNN; FOWLKES, 2003). Além disso, o sequestro de IGFs pelas IGFBPs pode ser importante para evitar os efeitos desfavoráveis dos IGFs, tais como hipoglicemia e proliferação celular descontrolada.

A Figura 6 resume as ações propostas das IGFBPs que dependem da ligação dos IGFs e da modulação da ativação dos IGF-IR. A atividade mitogênica dos IGFs é mediada através do IGF-IR e é inibida pelo seu sequestro pelas IGFBPs solúveis. A proteólise das IGFBPs leva à liberação dos IGFs e, portanto, potencialização da atividade do hormônio. Também existem IGFBPs intimamente relacionadas com a superfície de membrana das células, sendo essas responsáveis tanto por potencializar como por inibir os efeitos dos IGFs (FIRTH; BAXTER, 2002).

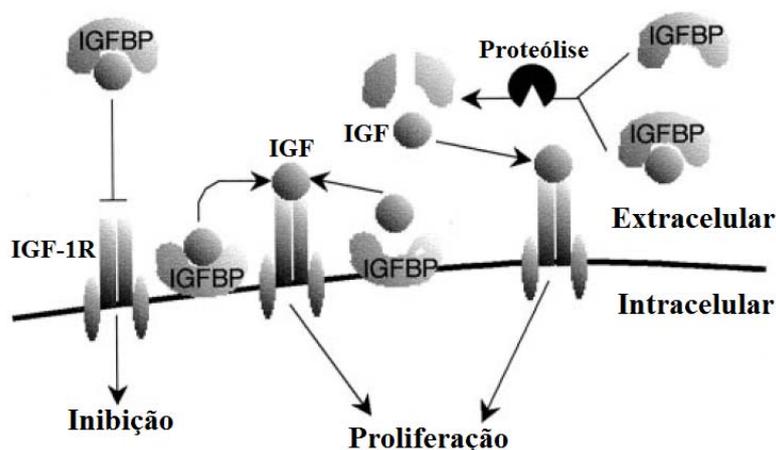


Figura 6 Vias propostas de ação das proteínas de ligação aos IGFs1 e 2 (IGFBPs)
Fonte: Adaptado de Firth e Baxter (2002)

2.4.4 Proteases das IGFBPs

Os IGFs devem ser liberados das IGFBPs para exercerem seus inúmeros efeitos biológicos (SILVA; FIGUEIREDO; VAN DEN HURK, 2009). De acordo com Bunn e Fowlkes (2003) diversos mecanismos podem ocorrer para a liberação dos IGFs das IGFBPs, sendo principalmente por meio da diminuição da afinidade dessas duas moléculas. Esses mecanismos incluem a ligação das IGFBPs a moléculas da matriz extracelular, a fosforilação das IGFBPs e também a degradação proteolítica das mesmas.

Dessa forma, a taxa de proteólise das IGFBPs é provavelmente regulada por múltiplos mecanismos e em várias etapas. Por exemplo, alteração na concentração das proteases das IGFBPs e/ou dos seus inibidores pode modular a taxa de degradação. Além disso, modificações como fosforilação e glicosilação podem também regular a taxa de proteólise das proteínas de ligação. Embora existam esses três mecanismos de regulação da biodisponibilidade dos IGFs, a clivagem proteolítica foi a única demonstrada em todas as seis IGFBPs, sendo, portanto, o mecanismo mais aceito para a liberação dos IGFs.

A ação de várias proteases em liberar os IGFs das IGFBPs tem sido identificada. As principais são as catepsinas que clivam as IGFBP-1 a -5 (CONOVER; DE LEON, 1994); a proteinase serina que é responsável pela clivagem da IGFBP-5 nas células (BUSBY et al., 2000) e as metaloproteinases matrixinas, adamalinas e papalinas que clivam a IGFBP-3 a -6 (BUNN; FOWLKES, 2003). De acordo com os mesmos autores, a clivagem das proteínas de ligação pode ocorrer de diferentes formas, sendo: a clivagem de uma IGFBP intacta, sem estar ligada ao IGF, gerando assim apenas fragmentos de IGFBP; pode ocorrer a quebra de uma IGFBP já ligada ao IGF, gerando fragmentos de IGFBP e a molécula de IGF intacta e, finalmente, a clivagem de uma IGFBP e do IGF a ela ligada, gerando assim fragmentos de IGFBP e IGF (Figura 7).

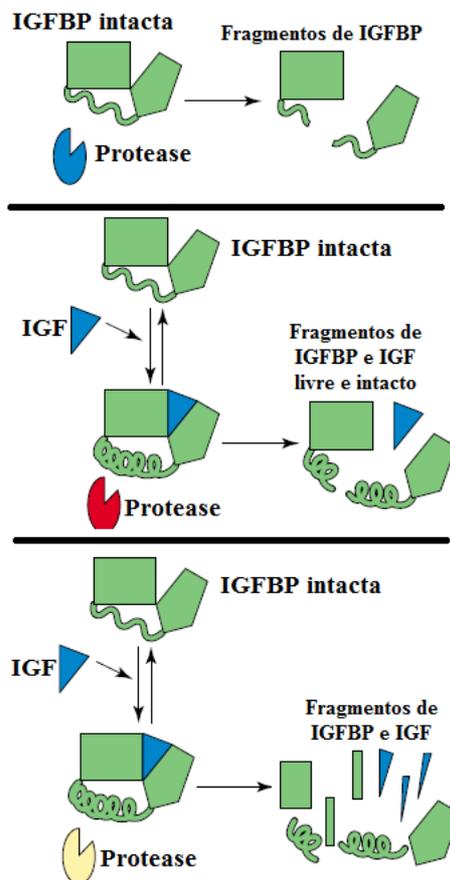


Figura 7 Papéis hipotéticos das ações das proteases das IGFBPs no mecanismo fisiológico da liberação dos IGFs
 Fonte: Adaptado de Bunn e Fowlkes (2003)

2.5 IGF-I na reprodução de fêmeas suínas

O IGF-I desempenha importante papel na reprodução de suínos, estando envolvido na maturação e fertilização ovocitária, desenvolvimento e implantação do embrião, bem como o crescimento e desenvolvimento do feto e placenta, influenciando assim, o tamanho da leitegada (ZACZEK et al., 2002). O IGF-I também apresenta efeito na foliculogênese em suínos, estando envolvido no processo de crescimento do folículo ovariano e formação do antro e FF (MONGET et al., 2002).

Dentre os efeitos do IGF-I no processo de fecundação, está a estimulação da proliferação e diferenciação das células da granulosa e na síntese de DNA por essas células (principal sítio de síntese, recepção e ação do IGF-I), sendo demonstrado em bovinos e suínos sua ação em estimular a proliferação mitótica e, ao mesmo tempo, aumentar a produção de esteróides induzida pelo FSH (SPICER; ALPIZAR; ECHTERNKAMP, 1993; VELAZQUEZ; SPICER; WATHES, 2008). Nas células da granulosa, a partir de um estímulo do IGF-I, há aumento da produção de progesterona, estrógeno e proteoglicanos, assim como uma indução na síntese de receptores de LH (SIMMEN et al., 1998).

Além dos fatores mencionados acima, o IGF-I também apresenta efeito no crescimento do tecido mamário (mamogênese) e diferenciação (lactogênese) durante a gestação e lactação de fêmeas suínas (LEE et al., 1993). Também tem sido observada uma associação entre a produção de IGF-I pelas células da tuba uterina e a capacidade fecundante dos espermatozoides, levando à suposição de que as concentrações desse hormônio estão relacionadas com as taxas de fertilização do rebanho (VELAZQUEZ; SPICER; WATHES, 2008).

2.6 Utilização do IGF-I na produção *in vitro* de embriões

Alguns estudos já foram realizados utilizando a adição de IGF-I nos meios de PIV de embriões (maturação, fertilização e cultivo) para suínos (CUI et al., 2005; GRUPEN; NAGASHIMA; NOTTLE, 1997; ILLERA et al., 1998; KIM et al., 2005; REED et al., 1993; XIA; TEKPETEY; ARMSTRONG, 1994); búfalos (PAWSHE; RAO; TOTEY, 1998; PUROHIT; BRADY; SHARMA, 2005; SINGHAL et al., 2009) e bovinos (NEIRA et al., 2010; SIRISATHIEN; HERNANDEZ-FONSECA; BRACKETT, 2003) (Tabela 2). Porém, considerando a espécie suína, até o momento, o papel do IGF-I na PIV de embriões continua desconhecido, assim, são necessárias mais pesquisas relativas ao tema.

Tabela 2. Efeitos da adição de IGF-I nos meios de PIV de embriões (maturação *in vitro* – MIV, fertilização *in vitro* – FIV e cultivo *in vitro* – CIV) em diversas espécies animais

Espécie	Meio de PIV	Doses IGF-I (ng/mL)	Resultados obtidos	Autores
Suínos	MIV	100	Nenhuma influência nas taxas de maturação (metáfase II) ovocitária	Reed et al. (1993)
Suínos	MIV FIV CIV	25 50 200	Aumento da clivagem de embriões na MIV (50 e 200 ng/mL de IGF-I) e na FIV e CIV (25 ng/mL IGF-I)	Xia, Tekpetey e Armstrong (1994)
Suínos	MIV	10 100	Nenhum efeito na maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário	Gruppen, Nagashima e Nottle (1997)
Suínos	MIV	100	Nenhum efeito nas taxas de formação de pró-núcleo, polispermia, penetração e degeneração ovocitária	Illera et al. (1998)
Búfalos	MIV CIV	1 10 100	IGF-I estimula a maturação ovocitária na dose de 100 ng/mL e, todas as doses estimulou a clivagem e a taxa de desenvolvimento de blastocistos	Pawshe, Rao e Totey (1998)

“Tabela 2, conclusão”

Espécie	Meio de PIV	Doses IGF-I (ng/mL)	Resultados obtidos	Autores
Bovinos	CIV	2 10 50	Nenhum efeito no número de embriões no estágio de quatro células e, aumento das taxas de embriões que chegaram à fase de blastocisto (10 e 50 ng/mL)	Sirisathien, Hernandez-Fonseca e Brackett (2003)
Suínos	CIV	10 100	Nenhum efeito na taxa de desenvolvimento até o estágio de duas células e formação de blastocisto	Cui et al. (2005)
Búfalos	MIV FIV CIV	50	Aumento no número de ovócitos em metáfase II, no número de ovócitos fertilizados e na taxa de clivagem dos embriões	Purohit, Brady e Sharma (2005)
Suínos	CIV	1 10 50 e 100	Maior número de embriões no estágio de duas células, número de blastocistos formados e clivados com 50 ng/mL de IGF-I	Kim et al. (2005)
Búfalos	MIV e CIV	100	Nenhum efeito na MIV. Aumento na taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário – blastocistos	Singhal et al. (2009)
Bovinos	CIV	50	Aumento na taxa de clivagem e na formação de blastocistos	Neira et al. (2010)

Reed et al. (1993) estudaram o efeito da adição de 0 e 100 ng/mL de IGF-I no meio de MIV em suínos, e observaram que a adição apenas do hormônio não influenciou a taxa de maturação dos ovócitos após 42 horas de cultivo. Houve efeito positivo do IGF-I apenas quando em associação com FF e fator de crescimento epidérmico (EGF).

Xia, Tekpetey e Armstrong (1994) avaliaram o efeito da adição de IGF-I (0, 25, 50 e 200 ng/mL) nos meios de MIV e FIV sobre as taxas de maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário em suínos. Nesse estudo foi observado que a adição de IGF-I (50 e 200 ng/mL), apenas no meio de MIV, aumentou a taxa de clivagem dos embriões e também o número de embriões que se desenvolveram além do estágio de oito células. Já a adição de 25 ng/mL de IGF-I apenas no meio de FIV, foi a que promoveu uma maior taxa de embriões clivados e desenvolvidos além de oito células. Portanto, nesse estudo, a adição de IGF-I demonstrou ser benéfica para o desenvolvimento embrionário quando presente no meio de MIV e FIV apenas. Porém, não foram avaliados os efeitos da adição do IGF-I sobre cada etapa da PIV de embriões individualmente, ou seja, o efeito sobre a maturação ovocitária e fertilização, sendo avaliados apenas os resultados finais de taxa de clivagem e embriões obtidos.

No estudo de Grupen, Nagashima e Nottle (1997) foi avaliado o efeito da adição de 10 e 100 ng/mL de IGF-I no meio de MIV sobre as taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário em suínos. Nesse trabalho, a adição de IGF-I no meio de MIV não afetou a porcentagem de ovócitos maturados (metáfase II), a taxa de fertilização e a incidência de polispermia. A taxa de zigotos que clivaram e a proporção que alcançou o estágio de oito células e estágio de blastocisto também não foram afetadas pelas concentrações de IGF-I adicionadas. Portanto, a adição de IGF-I não afetou a maturação ovocitária, a fertilização e o desenvolvimento embrionário.

Illera et al. (1998) avaliaram a adição de 100 ng/mL de IGF-I ao meio de MIV sobre a maturação e os parâmetros de fertilização, e não observaram efeitos nas taxas de formação de pró-núcleo, polispermia, penetração e degeneração ovocitária com o uso do hormônio. Efeitos benéficos do IGF-I apenas foram observados quando em combinação com gonadotrofinas (FSH e LH), FF e outros fatores de crescimento.

Mao et al. (2004) realizaram a adição de IGF-I no meio de cultivo de folículos ovarianos suínos e posterior maturação e cultivo dos ovócitos. Nesse estudo foi demonstrado que o IGF-I desempenhou uma importante função de regulação da apoptose e promoveu a replicação das células da granulosa. Isso poderia de certa forma, também estar relacionado à redução da polispermia nas condições atuais dos meios de MIV e FIV de ovócitos, podendo influenciar assim os resultados de fertilização.

Cui et al. (2005) trabalharam com a adição de 0, 10 e 100 ng/mL de IGF-I no meio de cultivo embrionário por sete dias, em embriões ativados partenogeneticamente. Foi observado que a taxa de desenvolvimento até o estágio de duas células e o número de células por embrião aos sete dias (blastocisto) não foram afetados pela presença do IGF-I.

Kim et al. (2005) investigaram o papel do IGF-I no desenvolvimento de embriões suínos produzidos por FIV e por transferência nuclear de células somáticas. Foram adicionadas ao meio de cultivo doses de 0, 1, 10, 50 e 100 ng/mL de IGF-I por um período de 168 horas. Foi observado que a dose de 50 ng/mL foi a que promoveu um maior número de embriões em estágio de duas células, número de blastocistos formados e clivados.

Apesar dos trabalhos já realizados, os efeitos do IGF-I acrescentado aos meios de MIV e FIV de ovócitos suínos são pouco relatados e detalhados, principalmente na avaliação de sua função nas várias etapas individuais da

técnica de PIV, principalmente na avaliação da maturação e fertilização ovocitária.

Diante disso, tendo em vista as inúmeras funções que o IGF-I desempenha, a determinação de níveis que possam ser adicionados aos meios de MIV que melhorem as taxas de maturação e os resultados da FIV na espécie suína será útil para posteriores pesquisas que possam ser realizadas com a PIV de embriões.

2.7 Adição de fluido folicular no meio de maturação *in vitro* de ovócitos suínos

O FF é composto de um transudato a partir do soro que se acumula nos folículos através da barreira sangue-folículo ovariano (BIJTTEBIER et al., 2008). Contém fatores de crescimento, eletrólitos, hormônios, aminoácidos e também fatores desconhecidos (DODE; GRAVES, 2003; IWATA et al., 2004; JEONG; YANG, 2001).

A competência ovocitária para maturação (citoplasmática e nuclear) e desenvolvimento (fertilização, formação de pró-núcleos e clivagem) na PIV de embriões suínos é influenciada pela presença de FF (VATZIAS; HAGEN, 1999). Está de acordo com essa informação o fato de que os ovócitos estão banhados por FF durante a maturação *in vivo*.

A suplementação dos meios de MIV de suínos com FF tem sido pesquisada há mais de 35 anos (FUNAHASHI; DAY, 1993; NAITO; FUKUDA; TOYODA, 1988; TSAFRIRI; CHANNING, 1975; YOSHIDA et al., 1992), sendo a adição de 10% de FF uma prática comum nos sistemas de FIV (BIJTTEBIER et al., 2008). A maioria dos trabalhos descreve que a adição de FF aumenta a expansão das células do *cumulus*, as taxas de maturação, penetração espermática, formação de pró-núcleo masculino e fertilização

monospermica em ovócitos suínos (ALGRIANY et al., 2004; ITO et al., 2008). No entanto, as moléculas responsáveis pelos efeitos benéficos do FF não foram identificadas. Além disso, ainda não há consenso se são moléculas presentes no FF ou o próprio fluido que apresenta influência benéfica na MIV, isso, pois existe uma grande variabilidade inerente à composição do FF (BIJTTEBIER et al., 2008).

Alguns estudos têm tentado produzir meios de MIV quimicamente definidos que apresentem elevadas taxas de produção de embriões sem o uso de FF (HONG et al., 2004; MARQUES et al., 2012). Acredita-se que a utilização do FF introduz uma série de fatores desconhecidos no meio de MIV, o que dificulta a padronização da técnica e a exata identificação das substâncias que são essenciais na regulação do processo (MARQUES et al., 2007). Entretanto, apesar do desenvolvimento de novos meios, a suplementação com FF ainda promove melhores resultados, o que explica a sua utilização global para a PIV de embriões suínos (KISHIDA; LEE; FUKUI, 2004). Além disso, quando não é utilizado FF nos meios de MIV, a suplementação do meio com fatores adicionais, tais como aminoácidos essenciais e não-essenciais, antioxidantes e EGF deve ser feita, aumentando os custos da técnica (HONG et al., 2004).

Pesquisas têm avaliado também a adição de FF no meio de MIV a partir de diferentes tamanhos de folículos, sendo comprovado que o efeito do FF na PIV de embriões é influenciado pelo diâmetro dos folículos do qual é obtido (ITO et al., 2008; YOON et al., 2000). Alguns estudos têm mostrado que a utilização de FF obtido a partir de folículos antrais maiores na MIV apresenta melhores resultados na produção de embriões suínos em comparação com o uso de fluidos obtidos de folículos menores (ALGRIANY et al., 2004; VATZIAS; HAGEN, 1999). Entretanto, no que diz respeito ao ovário das fêmeas suínas pré-púberes, que são os rotineiramente utilizados para a PIV de embriões, existe um elevado número de folículos pequenos (menores que 5,0 mm) (BAGG et al.,

2004; KNOX, 2005). Portanto, estudos que avaliem a viabilidade do uso de FF obtido de folículos pequenos adicionados ou não de outras substâncias na MIV de suínos são necessários na tentativa de maximizar a técnica.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A PIV de embriões suínos tem demonstrado ser uma técnica muito importante na avaliação dos mecanismos básicos envolvidos no processo de fecundação. Além disso, apresenta aplicabilidade nos estudos envolvendo o melhoramento genético, transgênese, clonagem e recuperação de raças em risco de extinção. Entretanto, apesar desses benefícios, a técnica ainda apresenta baixas taxas de sucesso, sendo um dos fatores responsáveis, as altas taxas de polispermia, pois gera uma porcentagem muito baixa de embriões obtidos, e os meios de cultivo utilizados, pois não propiciam um adequado processo de MIV, FIV e desenvolvimento embrionário.

Assim, mais estudos sobre os meios de cultivo empregados e a adição de novas substâncias a esses meios, avaliando-se a possibilidade de formulação de novos protocolos que apresentem melhores taxas de sucesso na PIV de embriões são necessários.

Dessa forma, o presente estudo atua de modo a colaborar para o melhor entendimento dos meios de PIV de embriões, ao se determinar os níveis fisiológicos de IGF-I presentes no FF de folículos ovarianos e, além disso, o estudo da adição desse hormônio no meio de MIV, com a finalidade de se obter uma maior taxa de maturação e melhores resultados de fertilização. Assim, os resultados desse estudo serão úteis para posteriores pesquisas, promovendo novas perspectivas relacionadas ao desenvolvimento de novos meios para a PIV de embriões suínos.

REFERÊNCIAS

ABEYDEERA, L. R. *In vitro* production of embryos in swine. **Theriogenology**, Los Altos, v. 57, n. 1, p. 256-273, Jan. 2002.

ABEYDEERA, L. R.; DAY, B. N. Fertilization and subsequent development *in vitro* of pig oocytes inseminated in a modified tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. **Biology of Reproduction**, New York, v. 57, n. 4, p. 729-734, Oct. 1997.

ALFIERI, J. A. et al. Infertility in female mice with an oocyte-specific knockout of GPI-anchored proteins. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 116, n. 11, p. 2149-2155, June 2003.

ALGRIANY, O. et al. Follicle size-dependent effects of sow follicular fluid on *in vitro cumulus* expansion, nuclear maturation and blastocyst formation of sow *cumulus* oocytes complexes. **Theriogenology**, Los Altos, v. 62, n. 8, p. 1483-1497, Nov. 2004.

ANTOSIK, P. et al. The morphology of porcine oocytes is associated with zona pellucida glycoprotein 3 and integrin beta 2 protein levels. **Veterinární Medicína**, Prague, v. 55, n. 4, p. 154-162, Apr. 2010.

ASANO, A.; NIWA, K. Activation and penetration *in vitro* of pig oocytes treated with calcium ionophore. **The Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 50, n. 1, p. 77-85, Feb. 2004.

BAGG, M.A. et al. Changes in ovarian, follicular, and oocyte morphology immediately after the onset of puberty are not accompanied by an increase in oocyte developmental competence in the pig. **Theriogenology**, Los Altos, v. 62, n. 6, p. 1003-1011, Sept. 2004.

BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA, Z. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. **Reproductive Biology**, Olsztyn, v. 6, n. 2, p. 161-193, July 2006.

BIJTTEBIER, J. et al. Preovulatory follicular fluid during *in vitro* maturation decreases polyspermic fertilization of *cumulus*-intact porcine oocytes *in vitro* maturation of porcine oocytes. **Theriogenology**, Los Altos, v. 70, n. 4, p. 715-724, Sept. 2008.

BUHI, W. C. Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. **Reproduction**, Cambridge, v. 123, n. 3, p. 355-362, Mar. 2002.

BUHI, W. C.; ALVAREZ, I. M.; KOUBA, A. J. Secreted proteins of the oviduct. . **Cells, Tissues, Organs**, Basel, v. 166, n. 2, p. 165-179, 2000.

BUNN, R. C.; FOWLKES, J. L. Insulin-like growth factor binding protein proteolysis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, New York, v. 14, n. 4, p. 176-181, May/June 2003.

BUREAU, M.; BAILEY, J. L.; SIRARD, M. A. Influence of oviductal cells and conditioned medium on porcine gametes. **Zygote**, Cambridge, v. 8, n. 2, p. 139-144, May 2000.

BUSBY, W. H. Jr. et al. The complement component C1s is the protease that accounts for cleavage of insulin-like growth factor-binding protein-5 in fibroblast medium. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 48, p. 37638-37644, Dec. 2000.

CALVERT, M. E. et al. Oolemmal proteomics--identification of highly abundant heat shock proteins and molecular chaperones in the mature mouse egg and their localization on the plasma membrane. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 1, n. 27, p. 1-10, Feb. 2003.

CHAKRAVARTHY, M. V. et al. Insulin-like growth factor-I extends *in vitro* replicative life span of skeletal muscle satellite cells by enhancing G1/S cell cycle progression via the activation of phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 46, p. 35942-35952, Nov. 2000.

CHAVES, J.; WASIF SAIF, M. IGF system in cancer: from bench to clinic. **Anti-Cancer Drugs**, Oxford, v. 22, n. 3, p. 206-212, Mar. 2011.

CLEMMONS, D. et al. Igf-I signaling in response to hyperglycemia and the development of diabetic complications. **Current Diabetes Reviews**, Sharjah, v. 7, n. 4, p. 235-245, July 2011.

CONOVER, C. A.; DE LEON, D. D. Acid-activated insulin-like growth factor-binding protein-3 proteolysis in normal and transformed cells. Role of cathepsin D. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, n. 10, p. 7076-7080, Mar. 1994.

COY, P. et al. Hardening of the zona pellucida of unfertilized eggs can reduce polyspermic fertilization in the pig and cow. **Reproduction: The Official Journal of the Society for the Study of Fertility**, Cambridge, v. 135, n. 1, p. 19-27, Jan. 2008a.

_____. Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm-zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 41, p. 15809-15814, Oct. 2008b.

_____. Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes matured under different systems. **Theriogenology**, Los Altos, v. 51, n. 4, p. 799-812, Mar. 1999.

_____. Sperm concentration influences fertilization and male pronuclear formation *in vitro* in pigs. **Theriogenology**, Los Altos, v. 40, n. 3, p. 539-546, Sept. 1993.

COY, P.; AVILÉS, M. What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte? **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, London, v. 85, n. 3, p. 593-605, Aug. 2010.

COY, P.; ROMAR, R. *In vitro* production of pig embryos: a point of view. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 14, n. 5/6, p. 275-286, 2002.

CUI, X. S. et al. Insulin-like growth factor-I alters apoptosis related genes and reduces apoptosis in porcine parthenotes developing *in vitro*. **Theriogenology**, Los Altos, v. 63, n. 4, p. 1070-1080, Mar. 2005.

DAI, J.; BAXTER, R. C. Regulation *in vivo* of the acid-labile subunit of the rat serum insulin-like growth factor-binding protein complex. **Endocrinology**, Springfield, IL, v. 135, n. 6, p. 2335-2341, Dec. 1994.

DODE, M. A.; GRAVES, C. N. Role of estradiol-17beta on nuclear and cytoplasmic maturation of pig oocytes. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, n. 1/2, p. 99-110, Sept. 2003.

DUBUC, A.; SIRARD, M. A. Effect of steroids and oviductal cells, from the different parts of the oviduct, on the incidence of monospermy in porcine *in vitro* fertilization. **Theriogenology**, Los Altos, v. 46, n. 3, p. 449-458, Aug. 1996.

ETO, K. et al. Functional classification of ADAMs based on a conserved motif for binding to integrin alpha 9beta 1: implications for sperm-egg binding and other cell interactions. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 20, p. 17804-17810, May 2002.

FAMILIARI, G. et al. Three-dimensional structure of the zona pellucida at ovulation. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 69, n. 6, p. 415-426, June 2006.

FAUSTINI, M. et al. Boar sperm encapsulation reduces *in vitro* polyspermy. **Reproduction in Domestic Animals**, Hamburg, v. 45, n. 2, p. 359-362, Apr. 2010.

FIRTH, S. M.; BAXTER, R. C. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 23, n. 6, p. 824-854, Dec. 2002.

FRYSTYK, J. Free insulin-like growth factors - measurements and relationships to growth hormone secretion and glucose homeostasis. **Growth Hormone & IGF Research**, London, v. 14, n. 5, p. 337-375, Oct. 2004.

FUNAHASHI, H.; DAY, B. N. Effects of follicular fluid at fertilization *in vitro* on sperm penetration in pig oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 99, n. 1, p. 97-103, Sept. 1993.

FUNAHASHI, H.; EKWALL, H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Zona reaction in porcine oocytes fertilized *in vivo* and *in vitro* as seen with scanning electron microscopy. **Biology of Reproduction**, New York, v. 63, n. 5, p. 1437-1442, Nov. 2000.

GADEA, J. Sperm factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility. **Theriogenology**, Los Altos, v. 63, n. 2, p. 431-444, Jan. 2005.

GARCÍA-VÁZQUEZ, F. A. et al. Production of transgenic piglets using ICSI-sperm-mediated gene transfer in combination with recombinase RecA. **Reproduction**, Cambridge, v. 140, n. 2, p. 259-272, Aug. 2010a.

_____. Transgénesis mediada por espermatozoides en la especie porcina: Efecto de la presencia de ADN exógeno sobre la calidad seminal y evaluación de la producción *en vivo* de embriones transgénicos. **Revista Científica**, Merida, VE, v. 20, n. 1, p. 81-88, 2010b.

GIL, M. A. et al. Boar semen variability and its effects on IVF efficiency. **Theriogenology**, Los Altos, v. 70, n. 8, p. 1260-1268, Nov. 2008.

_____. Influence of sperm:oocyte ratio during *in vitro* fertilization of *in vitro* matured *cumulus*-intact pig oocytes on fertilization parameters and embryo development. **Theriogenology**, Los Altos, v. 61, n. 2/3, p. 551-560, Jan. 2004.

GRUPEN, C. G.; NAGASHIMA, H.; NOTTLE, M. B. Role of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on porcine oocyte maturation and embryonic development *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 9, n. 6, p. 571-575, 1997.

HAMMER, R. E. et al. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. **Nature**, London, v. 315, n. 6021, p. 680-683, 1985.

HAN, Y. M. et al. Pronuclear location before the first cell division determines ploidy of polyspermic pig embryos. **Biology of Reproduction**, New York, v. 61, n. 5, p. 1340-1346, Nov. 1999.

HATANAKA, Y. et al. Changes in the properties and composition of zona pellucida of pigs during fertilization *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 95, n. 2, p. 431-440, July 1992.

HEMLER, M. E. Tetraspanin functions and associated microdomains. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 6, n. 10, p. 801-811, Oct. 2005.

HIGASHI, Y. et al. Aging, atherosclerosis, and IGF-I. **The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences**, Washington, v. 67, n. 6, p. 626-639, June 2012.

HOLMAN, S. R.; BAXTER, R. C. Insulin-like growth factor binding protein-3: factors affecting binary and ternary complex formation. **Growth Regulation**, Edinburgh, v. 6, n. 1, p. 42-47, Mar. 1996.

HONG, J. Y. et al. Effects of amino acids on maturation, fertilization and embryo development of pig follicular oocytes in two IVM media.

Theriogenology, Los Altos, v. 62, n. 8, p. 1473-1482, Nov. 2004.

HWA, V.; OH, Y.; ROSENFELD, R. G. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 20, n. 6, p. 761-787, Dec. 1999.

ILLERA, M. J. et al. Developmental competence of immature pig oocytes under the influence of EGF, IGF-I, follicular fluid and gonadotropins during IVM-IVF processes. **The International Journal of Developmental Biology**, Vizcaya, v. 42, n. 8, p. 1169-1172, Nov. 1998.

ITO, M. et al. Effect of follicular fluid collected from various diameter follicles on the progression of nuclear maturation and developmental competence of pig oocytes. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 106, n. 3/4, p. 421-430, July 2008.

IWATA, H. et al. Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes. **Reproduction**, Cambridge, v. 127, n. 2, p. 159-164, Feb. 2004.

JEONG, B. S.; YANG, X. Cysteine, glutathione, and Percoll treatments improve porcine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 59, n. 3, p. 330-335, July 2001.

JIMÉNEZ, C. et al. Biotechnology on reproduction in swine. **Journal of Applied Sciences Research**, New Jersey, v. 3, n. 12, p. 1917-1920, 2007.

KAWARSKY, S. J. et al. Chromosomal abnormalities in bovine embryos and their influence on development. **Biology of Reproduction**, New York, v. 54, n. 1, p. 53-59, Jan. 1996.

KIDSON, A. et al. The effect of oviductal epithelial cell co-culture during *in vitro* maturation on sow oocyte morphology, fertilization and embryo development. **Theriogenology**, Los Altos, v. 59, n. 9, p. 1889-1903, May 2003.

KIM, B.; VAN GOLEN, C. M.; FELDMAN, E. L. Insulin-like growth factor-I signaling in human neuroblastoma cells. **Oncogene**, Basingstoke, v. 23, n. 1, p. 130-141, Jan. 2004.

KIM, H. S. et al. Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, n. 24, p. 12981-12986, Nov. 1997a.

KIM, N. H. et al. Involvement of adrenergic system on the cortical granule exocytosis and polyspermic penetration during *in vitro* fertilization of porcine oocytes. **Theriogenology**, Los Altos, v. 48, n. 8, p. 1351-1360, Dec. 1997b.

KIM, S. et al. Embryotropic effect of insulin-like growth factor (IGF)-I and its receptor on development of porcine preimplantation embryos produced by *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 72, n. 1, p. 88-97, Sept. 2005.

KISHIDA, R.; LEE, E. S.; FUKUI, Y. *In vitro* maturation of porcine oocytes using a defined medium and developmental capacity after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology**, Los Altos, v. 62, n. 9, p. 1663-1676, Dec. 2004.

KNOX, R. V. Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v. 29, n. 2, p. 385-397, Aug. 2005.

KOO, D. B. et al. Effects of *in vitro* fertilization conditions on preimplantation development and quality of pig embryos. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 90, n. 1/2, p. 101-110, Nov. 2005.

KOUBA, A. J. et al. Effects of the porcine oviduct-specific glycoprotein on fertilization, polyspermy, and embryonic development *in vitro*. **Biology of Reproduction**, New York, v. 63, n. 1, p. 242-250, July 2000.

LACKEY, B. R.; GRAY, S. L.; HENRICKS, D. M. The insulin-like growth factor (IGF) system and gonadotropin regulation: actions and interactions. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, Oxford, v. 20, n. 3/4, p. 201-217, Sep./Dec. 1999.

LARSSON, B.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Can we use *in vitro* fertilization tests to predict semen fertility? **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60/61, p. 327-336, July 2000.

LASIENĖ, K. et al. Morphological criteria of oocyte quality. **Medicina (Kaunas)**, Kaunas, v. 45, n. 7, p. 509-515, July 2009.

LEE, S. et al. Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 96, n. 3, p. 1097-1104, Mar. 2004.

_____. Expression of components of the insulin-like growth factor system in pig mammary glands and serum during pregnancy and pseudopregnancy: effects of oestrogen. **The Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 137, n. 3, p. 473-483, June 1993.

LONG, C. R.; DOBRINSKY, J. R.; JOHNSON, L. A. *In vitro* production of pig embryos: comparisons of culture media and boars. **Theriogenology**, Los Altos, v. 51, n. 7, p. 1375-1390, May 1999.

MACHADO, M. O papel dos micro-traumas e das células satélites na plasticidade muscular. **Arquivos em Movimento**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 1, p. 103-117, jan./jun. 2007.

MAO, J. et al. Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis *in vitro*. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, n. 7, p. 1967-1975, July 2004.

MARQUES, M. G. et al. Effect of low oxygen tension atmosphere and maturation media supplementation on nuclear maturation, cortical granules migration and sperm penetration in swine *in vitro* fertilization. **Reproduction in Domestic Animals**, Hamburg, v. 47, n. 3, p. 491-497, June 2012.

_____. *In vitro* maturation of pig oocytes with different media, hormone and meiosis inhibitors. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 97, n. 3/4, p. 371-181, Feb. 2007.

MATÁS, C. et al. Effect of sperm preparation method on *in vitro* fertilization in pigs. **Reproduction**, Cambridge, v. 125, n. 1, p. 133-141, Jan. 2003.

MCCAULEY, T. C. et al. Oviduct-specific glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization *in vitro*. **Biology of Reproduction**, New York, v. 69, n. 3, p. 828-834, Sept. 2003.

MICHELMANN, H. W. et al. Structural and functional events on the porcine zona pellucida during maturation, fertilization and embryonic development: a scanning electron microscopy analysis. **Reproduction in Domestic Animals**, Hamburg, v. 42, n. 6, p. 594-602, Dec. 2007.

MONGET, P. et al. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v. 23, n. 1, p. 139-154, July 2002.

MORBECK, D. E. et al. Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilt. **Biology of Reproduction**, New York, v. 47, n. 3, p. 485-491, Sept. 1992.

MUGNIER, S. et al. New insights into the mechanisms of fertilization: comparison of the fertilization steps, composition, and structure of the zona pellucida between horses and pigs. **Biology of Reproduction**, New York, v. 81, n. 5, p. 856-870, Nov. 2009.

NAGAI, T. *In vitro* maturation and fertilization of pig oocytes. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 153-163, Apr. 1996.

NAITO, K.; FUKUDA, Y.; TOYODA, Y. Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured *in vitro*. **Gamete Research**, New York, v. 21, n. 3, p. 289-295, Nov. 1988.

NAKANO, M.; YONEZAWA, N. Localization of sperm ligand carbohydrate chains in pig zona pellucida glycoproteins. **Cells, Tissues, Organs**, Basel, v. 168, n. 1/2, p. 65-75, 2001.

NEIRA, J. A. et al. Effect of the association of IGF-I, IGF-II, bFGF, TGF-beta1, GM-CSF, and LIF on the development of bovine embryos produced *in vitro*. **Theriogenology**, Los Altos, v. 73, n. 5, p. 595-604, Mar. 2010.

NOLTING, D. et al. Histological examinations of bone and cartilage in the axial skeleton of human triploidy fetuses. **APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 110, n. 2, p. 186-192, Feb. 2002.

OBERLENDER, G. et al. Aspectos relacionados à ocorrência da polispermia durante a fertilização *in vitro* (FIV) em suínos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 19, n. 2, p. 1-28, jul. 2012.

ODLE, J.; ZIJLSTRA, R. T.; DONOVAN, S. M. Intestinal effects of milkborne growth factors in neonates of agricultural importance. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 2509-2522, Oct. 1996.

OH, Y. et al. Synthesis and characterization of insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-7. Recombinant human mac25 protein specifically binds IGF-I and -II. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271, n. 48, p. 30322-30325, Nov. 1996.

OHLSSON, C. et al. The role of liver-derived insulin-like growth factor-I. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 30, n. 5, p. 494-535, Aug. 2009.

PARK, C. K.; SIRARD, M. A. The effect of preincubation of frozen-thawed spermatozoa with oviductal cells on the *in vitro* penetration of porcine oocytes. **Theriogenology**, Los Altos, v. 46, n. 7, p. 1181-1189, Nov. 1996.

PAWSHE, C. H.; RAO, K. B.; TOTEY, S. M. Effect of insulin-like growth factor I and its interaction with gonadotropins on *in vitro* maturation and embryonic development, cell proliferation, and biosynthetic activity of *cumulus*-oocyte complexes and granulosa cells in buffalo. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 49, n. 3, p. 277-285, Mar. 1998.

PUROHIT, G. N.; BRADY, M. S.; SHARMA, S. S. Influence of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on nuclear maturation and fertilization of buffalo *cumulus* oocyte complexes in serum free media and their subsequent development *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 87, n. 3/4, p. 229-239, July 2005.

RATH, D. et al. Structural, biochemical and functional aspects of sperm-oocyte interactions in pigs. **Society of Reproduction and Fertility Supplement**, Nottingham, v. 62, p. 317-330, 2006.

REED, M. L. et al. Effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor-I, and dialyzed porcine follicular fluid on porcine oocyte maturation *in vitro*. **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 266, n. 1, p. 74-78, May 1993.

REINECKE, M. Insulin-like growth factors and fish reproduction. **Biology of Reproduction**, New York, v. 82, n. 4, p. 656-661, Apr. 2010.

ROMAR, R. et al. Effect of oviductal and *cumulus* cells on zona pellucida and cortical granules of porcine oocytes fertilized *in vitro* with epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 85, n. 3/4, p. 287-300, Feb. 2005.

_____. Effect of co-culture of porcine sperm and oocytes with porcine oviductal epithelial cells on *in vitro* fertilization. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 68, n. 1/2, p. 85-98, Oct. 2001.

ROSENDAL, L. et al. Physical capacity influences the response of insulin-like growth factor and its binding proteins to training. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 93, n. 5, p. 1669-1675, Nov. 2002.

RUIZ-SÁNCHEZ, A. L. et al. The predictive value of routine semen evaluation and IVF technology for determining relative boar fertility. **Theriogenology**, Los Altos, v. 66, n. 4, p. 736-748, Sept. 2006.

RUSSO, V. C. et al. The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 26, n. 7, p. 916-943, Dec. 2005.

SALMON, W. D. Jr.; DAUGHADAY, W. H. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage *in vitro*. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 49, n. 6, p. 825-836, June 1957.

SATHANANTHAN, A. H. et al. From oogonia to mature oocytes: inactivation of the maternal centrosome in humans. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 69, n. 6, p. 396-407, June 2006.

SILVA, J. R.; FIGUEIREDO, J. R.; VAN DEN HURK, R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. **Theriogenology**, Los Altos, v. 71, n. 8, p. 1193-1208, May 2009.

SIMMEN, F. A. et al. The porcine insulin-like growth factor system: at the interface of nutrition, growth and reproduction. **The Journal of Nutrition**, Springfield, IL, v. 128, n. 2, p. 315S-320S, Feb. 1998.

SINGHAL, S. et al. Effect of including growth factors and antioxidants in maturation medium used for *in vitro* culture of buffalo oocytes recovered *in vivo*. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 113, n. 1/4, p. 44-50, July 2009.

SIRISATHIEN, S.; HERNANDEZ-FONSECA, H. J.; BRACKETT, B. G. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 77, n. 1/2, p. 21-32, May 2003.

SOMFAI, T. et al. *In vitro* development of polyspermic porcine oocytes: Relationship between early fragmentation and excessive number of penetrating spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 107, n. 1/2, p. 131-147, Aug. 2008.

SPICER, L. J.; ALPIZAR, E.; ECHTERNKAMP, S. E. Effects of insulin, insulin-like growth factor-1 and gonadotropins on bovine granulosa cells proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth-factor-1 production *in vitro*. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, n. 5, p. 1232-1241, May 1993.

SPICER, L. J.; ECHTERNKAMP, S. E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v. 12, n. 3, p. 223-245, July 1995.

SPINOLA E CASTRO, A. M.; GUERRA-JÚNIOR, G. GH/IGF e neoplasia: o que há de novo nesta associação. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 49, n. 5, p. 833-842, out. 2005.

STRATIKOPOULOS, E. et al. The hormonal action of IGF1 in postnatal mouse growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 49, p. 19378-19383, Dec. 2008.

SUZUKI, H. et al. *In vitro* fertilization and polyspermy in the pig: Factors affecting fertilization rates and cytoskeletal reorganization of the oocyte. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 61, n. 4, p. 327-334, July 2003.

TALBOT, P.; DANDEKAR, P. Perivitelline space: does it play a role in blocking polyspermy in mammals? **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 61, n. 4, p. 349-357, July 2003.

TSAFRIRI, A.; CHANNING, C. P. An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis *in vitro*. **Endocrinology**, Springfield, IL, v. 96, n. 4, p. 922-927, Apr. 1975.

VATZIAS, G.; HAGEN, D. R. Effects of porcine follicular fluid and oviduct-conditioned media on maturation and fertilization of porcine oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**, New York, v. 60, n. 1, p. 42-48, Jan. 1999.

VELAZQUEZ, M. A.; SPICER, L. J.; WATHES, D. C. The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v. 35, n. 4, p. 325-342, Nov. 2008.

VINCENT, A. M.; FELDMAN, E. L. Control of cell survival by IGF signaling pathways. **Growth Hormone & IGF Research**, London, v. 12, n. 4, p. 193-197, Aug. 2002.

WABERSKI, D. et al. Importance of sperm-binding assays for fertility prognosis of porcine spermatozoa. **Theriogenology**, Los Altos, v. 63, n. 2, p. 470-484, Jan. 2005.

WANG, D. S. et al. Discovery of a gonad-specific IGF subtype in teleost. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 367, n. 2, p. 336-341, Mar. 2008.

WANG, W. H.; DAY, B. N.; WU, G. M. How does polyspermy happen in mammalian oocytes? **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 61, n. 4, p. 335-341, July 2003.

WASSARMAN, P. M. et al. Recent aspects of mammalian fertilization research. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 234, n. 1/2, p. 95-103, Apr. 2005.

WU, G. M. et al. Birth of piglets by *in vitro* fertilization of zona-free porcine oocytes. **Theriogenology**, Los Altos, v. 62, n. 8, p. 1544-1556, Nov. 2004.

XIA, P. et al. Ultrastructural study of polyspermy during early embryo development in pigs, observed by scanning electron microscope and transmission electron microscope. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 303, n. 2, p. 271-275, Feb. 2001.

XIA, P.; TEKPETEY, F. R.; ARMSTRONG, D. T. Effect of IGF-I on pig oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development *in vitro*, and on granulosa and *cumulus* cell biosynthetic activity. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 38, n. 4, p. 373-379, Aug. 1994.

XU, Z. et al. Spontaneous activation of ovulated mouse eggs: time-dependent effects on M-phase exit, cortical granule exocytosis, maternal messenger ribonucleic acid recruitment, and inositol 1,4,5-trisphosphate sensitivity. **Biology of Reproduction**, New York, v. 57, n. 4, p. 743-750, Oct. 1997.

YAKAR, S. et al. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 13, p. 7324-7329, June 1999.

YOSHIDA, M. et al. Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes *in vitro* and on their subsequent fertilizing and developmental capacity *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 95, n. 2, p. 481-488, July 1992.

YOON, K. W. et al. Development of porcine oocytes from preovulatory follicles of different sizes after maturation in media supplemented with follicular fluids. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 12, n. 3/4, p. 133-139, 2000.

YOU, J. et al. Pig oocytes with a large perivitelline space matured *in vitro* have greater developmental competence after parthenogenesis and somatic cell nuclear transfer. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 23, n. 1, p. 139-139, Dec. 2010.

ZACZEK, D. et al. Impact of growth hormone resistance on female reproductive function: new insights from growth hormone receptor knockout mice. **Biology of Reproduction**, New York, v. 67, n. 4, p. 1115-1124, Oct. 2002.

ZHANG, W. et al. Advances on *in vitro* production and cryopreservation of porcine embryos. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.132, n. 3/4, p. 115-122, June 2012.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Concentração do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I no fluido folicular suíno coletado de folículos ovarianos de diferentes diâmetros

Artigo segue as normas e formato do periódico *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition** ao qual foi submetido.

*Este artigo é uma versão preliminar, considerando que o conselho editorial da revista poderá sugerir alterações para adequá-lo ao seu próprio estilo.

Concentração do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I no fluido folicular suíno coletado de folículos ovarianos de diferentes diâmetros

Título curto: IGF-I no fluido folicular de folículos ovarianos em suínos

G. Oberlender*, L. D. S. Murgas, M. G. Zangeronimo, T. P. Pontelo, T. A. Menezes e A. C. Silva

Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil.

***Autor para correspondência:** Guilherme Oberlender, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Medicina Veterinária (DMV), Setor de Fisiologia e Farmacologia. Caixa postal 3037, CEP 37.200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil. Tel: +55 35 3829 1148; Fax: +55 35 3829 1148; E-mail: guilherme_oberlender@yahoo.com.br

Resumo

Objetivou-se quantificar as concentrações do IGF-I livre no soro e no fluido de folículos ovarianos de fêmeas suínas pré-púberes e descrever a morfometria ovariana, por meio da mensuração das dimensões dos ovários e da contagem do número de folículos superficiais. Ovários (n = 1.000) foram obtidos de fêmeas pré-púberes (5 a 6 meses/peso aproximado de 100 kg) imediatamente após o abate em Matadouro/Frigorífico. Foi realizado um total de 10 coletas, sendo em cada, obtidos ovários de 50 fêmeas. Os folículos localizados na superfície de cada ovário foram classificados em pequenos (FPs, 2 a 5 mm de diâmetro) ou grandes (FGs, 6 a 10 mm de diâmetro) e o fluido folicular foi obtido por aspiração dos folículos. A coleta do soro foi realizada após a exsanguinação das

fêmeas com o uso de tubos de ensaio de 10 mL. A partir do *pool* de fluido folicular e do soro obtido das 50 fêmeas em cada coleta, determinou-se a concentração de IGF-I livre por meio de kit de ensaio imunoenzimático (ELISA). A descrição da morfometria ovariana foi realizada em 100 ovários provenientes de 50 fêmeas escolhidas aleatoriamente. Foi mensurado o comprimento maior e menor dos ovários e, também, contabilizado o número total de FPs e FGs presentes na superfície de cada ovário. A concentração de IGF-I foi superior ($p < 0,05$) nos FGs ($170,92 \pm 88,29$ ng/mL) em comparação com os FPs ($67,39 \pm 49,90$ ng/mL) e o sérico ($73,48 \pm 34,63$ ng/mL). O comprimento maior e menor dos ovários foi de $26,0 \pm 3,0$ mm e $19,0 \pm 2,0$ mm, respectivamente. O número de FPs ($70,86 \pm 25,76$) foi maior ($p < 0,01$) em comparação com os FGs ($6,54 \pm 5,26$). Conclui-se que FGs apresentam níveis de IGF-I superiores aos FPs, e ao sangue, sendo isso relacionado a maior atividade dos FGs e à diferenciação que os mesmos sofrem para a ovulação. Além disso, ovários de fêmeas suínas pré-púberes apresentam elevado número de FPs em comparação aos FGs.

Palavras-chave: desenvolvimento folicular, IGF-I, morfometria ovariana, reprodução, suínos

Introdução

O desenvolvimento dos folículos ovarianos durante o ciclo estral em mamíferos envolve um processo coordenado de replicação e diferenciação celular. Esse processo eleva o número de células da granulosa que revestem o ovócito, a formação e expansão do antro folicular e também a formação do fluido folicular (FF) (Clarke et al., 2006). Além disso, o crescimento folicular é

extremamente importante, pois apenas folículos grandes (entre 7 a 10 mm de diâmetro, em suínos) ovulam (Bolamba e Sirard, 2000).

Nesse contexto, o papel dos fatores de crescimento no desenvolvimento folicular, entre eles o IGF-I (Samaras et al., 1994; Monget et al., 2002), tem sido amplamente estudado, pois sabe-se que esse hormônio atua promovendo tanto o crescimento quanto a diferenciação das células da granulosa, o desenvolvimento dos folículos pré-antrais e a formação do antro folicular (Mao et al., 2004).

O primeiro estudo relatando a presença de IGF-I no ovário de fêmeas suínas foi descrito por Hammond et al. (1985), que isolaram folículos ovarianos superficiais e quantificaram a concentração de IGF-I presente no FF. Estudos posteriores têm demonstrado a participação deste fator de crescimento em inúmeras funções ovarianas como, por exemplo, no aumento da esteroidogênese induzida pelo FSH, aumento da produção de progesterona e também de andrógenos (Spicer e Echterkamp, 1995). Esses efeitos são mediados através da ligação do IGF-I aos receptores específicos presentes nas células da granulosa (Pawshé et al., 1998).

Cerca de 80% do IGF-I circulante no sangue é derivado do fígado, onde a produção é estimulada pelo hormônio do crescimento (GH), seu principal regulador (Frystyk, 2004; Higashi et al., 2012). No entanto, de acordo com Daftary e Gore (2005), o IGF-I também pode ser produzido por outros tecidos, por exemplo, nas células da granulosa dos folículos ovarianos (Hammond et al., 1985).

Estudos em bovinos e equinos têm mostrado que as concentrações de IGF-I livre (biologicamente ativo) no FF aumentam durante o crescimento e seleção folicular e são maiores em FGs (pré-ovulatórios) em comparação com folículos subordinados (Santiago et al., 2005; Spicer et al., 2005). Por outro lado, poucos estudos têm avaliado a concentração fisiológica de IGF-I livre presente no FF de fêmeas suínas.

Hammond et al. (1985) e Howard e Ford (1992) avaliaram a concentração de IGF-I no FF por meio da mensuração total (livre e ligado às proteínas) do hormônio. De acordo com Frystyk (2004), a avaliação da concentração total como estimativa do IGF-I é amplamente empregada devido à falta de ensaios para IGF-I livre disponíveis. Entretanto, as proteínas de ligação ao IGF (IGFBPs) podem alterar a bioatividade do IGF-I sem alterar as concentrações mensuráveis do hormônio. Portanto, a concentração de IGF-I pode estar mais correlacionada com as suas frações livres do que com o total.

Tendo em vista as funções do IGF-I na reprodução das fêmeas, seus efeitos ovarianos e sua presença no FF, pesquisas têm sido realizadas utilizando a sua adição aos meios de produção *in vitro* (PIV) de embriões suínos (Reed et al., 1993; Xia et al., 1994; Grupen et al., 1997; Illera et al., 1998; Cui et al., 2005; Kim et al., 2005). No entanto, apesar do desenvolvimento das técnicas de maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) de embriões, essas ainda apresentam várias limitações, como os altos índices de polispermia (Coy e Romar, 2002). Portanto ainda não está estabelecido o melhor protocolo a ser utilizado nas diversas etapas da técnica de PIV de embriões, sendo a adição de hormônios e outras substâncias uma possível alternativa no aprimoramento da técnica para a obtenção de melhores resultados.

Na MIV é utilizada comumente a adição de FF obtido a partir de folículos grandes (acima de 5 mm) (Vatzias e Hagen, 1999; Algriany et al., 2004). Entretanto, os ovários de fêmeas suínas pré-púberes, que são os frequentemente utilizados na MIV (Coy e Romar, 2002), possuem um elevado número de folículos pequenos (menor que 5 mm) (Bagg et al., 2004; Knox, 2005). Desta forma, a obtenção de FF de FGs (acima de 5 ou 6 mm de diâmetro) é limitada pelo pequeno número desses nos ovários. Portanto, estudos com o objetivo de avaliar novas técnicas que viabilizem o uso de FF obtido de folículos

pequenos adicionados ou não de outras substâncias/fatores na MIV são necessários na tentativa de maximizar a técnica, além de poder representar grande avanço na PIV de embriões suínos.

O passo inicial antes da avaliação dos efeitos da adição de hormônios, entre eles o IGF-I, nos meios de PIV de embriões com o uso de FF, é determinar as concentrações fisiológicas presentes nos folículos ovarianos, para assim conhecer melhor as condições para a realização de FIV com a adição desse hormônio. Diante do exposto, objetivou-se avaliar a concentração fisiológica de IGF-I livre presente no FF de fêmeas suínas pré-púberes, coletado a partir de folículos antrais de diferentes tamanhos. Além disso, determinar o tamanho dos ovários e número total de folículos de duas diferentes classes de diâmetro na superfície dos mesmos.

Materiais e métodos

Ética

O presente estudo foi realizado após a aprovação institucional da Universidade Federal de Lavras (UFLA), sendo todo protocolo experimental conduzido de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais dessa instituição sob o protocolo número 009/10.

Local de realização e animais

O experimento foi realizado no laboratório de fertilização *in vitro* e cultivo de embriões de suínos, localizado no Departamento de Medicina Veterinária da UFLA. Todo material biológico foi obtido em abatedouro

(“Matadouro/Frigorífico NUTRILP”) situado na cidade de Lavras, Minas Gerais, Brasil, durante os meses de maio a outubro de 2012. Um total de 500 fêmeas pré-púberes Landrace × Large White (linhagem híbrida comercial – Genética AGROCERES) com idade entre 5 a 6 meses e peso médio entre 90 a 100 kg foram utilizadas.

Reagentes e meios para manipulação

O tampão fosfato salino (PBS) foi adquirido da Empresa Dako North America, Inc. (Califórnia, Estados Unidos). O kit para detecção do IGF-I foi obtido da Empresa USCN Life Science, Inc. (Califórnia, Estados Unidos). Salvo qualquer outra indicação em contrário, todos os demais produtos e reagentes utilizados foram adquiridos da Empresa Sigma-Aldrich Química S.A. (São Paulo, Brasil). Todos os meios utilizados foram preparados utilizando água ultra-pura – Milli-Q, 18,2 M Ω cm⁻¹ (Direct-Q 5, Millipore, Darmstadt, Alemanha).

Coleta dos ovários

Ovários isolados (n = 1.000) de 500 fêmeas suínas pré-púberes foram coletados após a realização do abate. Seguida à coleta, os ovários foram transportados até o laboratório, dentro de um período máximo de uma hora, em solução de NaCl 0,9% (w:v) contendo 0,1% de sulfato de kanamicina à temperatura de 38°C. Posteriormente, os ovários foram lavados três vezes em solução de cetrimida (brometo de hexadeciltrimetilamônio) 0,04% (v:v), seguido de mais três vezes em solução salina, ambas a 38°C (Coy et al., 2008). Após, realizou-se o processo de obtenção do FF dos folículos ovarianos.

Coleta e preparação do fluido folicular

O tempo decorrido desde o abate dos animais até a obtenção do FF não excedeu quatro horas. Com o uso de uma agulha 18G e uma seringa de 10 mL descartável, foi aspirado o FF dos folículos antrais localizados na superfície de cada um dos ovários coletados, sendo separados em duas categorias: folículos pequenos (FPs, 2 a 5 mm de diâmetro) e folículos grandes (FGs, 6 a 10 mm de diâmetro) (Knox, 2005; Ito et al., 2008). Uma vez aspirado, o *pool* de FF obtido de cada uma das categorias (FFPs, FF de folículos pequenos e FFGs, FF de folículos grandes) foi centrifugado a $1.500 \times g$ por 30 minutos a 24°C para remoção de células foliculares, ovarianas e debris (Park et al., 2009). Em seguida, o sobrenadante obtido foi coletado e filtrado em filtros de membrana de 0,22 μm (Millex-GP, Merck Millipore, Massachusetts, Estados Unidos), aliquotados em microtubos de 1,0 mL e imediatamente armazenados a $-20^{\circ}C$ até a realização das análises (Asano e Niwa, 2004). Durante o processo de aspiração dos folículos, os ovários permaneceram em béquer de vidro (1.000 mL) imersos em solução salina adicionada com 0,1% de sulfato de kanamicina sobre placa aquecedora a 37°C.

Avaliação da morfometria ovariana

A morfometria ovariana foi avaliada por meio da mensuração do comprimento maior e menor, com uso de régua graduada em milímetros, dos ovários das fêmeas. A contagem do número de FPs e FGs presentes na superfície ovariana foi realizada segundo Rhind e Schanbacher (1991).

Coleta de sangue

Após o atordoamento elétrico das fêmeas, amostras de sangue foram coletadas durante a exsanguinação usando tubos de ensaio estéreis de 10 mL com gel ativador de coágulo (Labor Import, Shandong Weichai Huafeng Power Co.Ltd.-RPC, Weifang Shandong, Shandong, China). Em seguida, as amostras obtidas foram acondicionadas em caixa de isopor com gelo e transportadas até o laboratório. As amostras de sangue foram mantidas por uma hora a temperatura ambiente (24°C) e então centrifugadas a $1.000 \times g$ por 20 minutos a 4°C em centrífuga refrigerada (Megafuge 16R, Thermo Scientific, Bremen, Alemanha). Imediatamente após a centrifugação foi coletado de cada amostra o equivalente a 1,5 mL de soro e adicionados conjuntamente em béquer de vidro de 250 mL (Chatterjee et al., 2001). Posteriormente, do *pool* de soro obtido foram preparadas alíquotas de 1,0 mL em microtubos e armazenadas em ultra freezer a temperatura de -80°C até a realização das análises.

Ensaio para determinação do IGF-I livre

Para as análises hormonais, as amostras de soro e FF foram descongeladas e diluídas (1:1.000) em tampão fosfato salino (PBS, pH 7,0, 0,02 mol/L). A concentração de IGF-I livre no soro e no FF foi determinada por teste imunoenzimático – ELISA (E90050Po ELISA kit 1×96 well), específico para o fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) suíno. Todo o ensaio foi realizado em triplicata, de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. A sensibilidade mínima do teste foi 0,0066 ng/mL e o coeficiente de variação (CV) intra e inter-ensaio foi $<10\%$ e $<12\%$, respectivamente. A densidade óptica resultante da leitura das amostras foi obtida a partir de um

fotômetro leitor de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) e a concentração de IGF-I calculada a partir de uma curva padrão em log-log.

Desenho experimental

Para a aquisição das 500 fêmeas (1.000 ovários) utilizadas foram realizadas dez repetições (dias de coleta), sendo que em cada uma, ovários e amostras de soro sanguíneo de 50 fêmeas foram coletados e manipulados conforme descrito anteriormente. Assim, a cada dia de coleta foram obtidas as amostras de sangue e FFPs e FFGs.

Para a avaliação da morfometria dos ovários (comprimento e largura) e também do número de folículos na superfície ovariana, utilizou-se um total de 100 ovários provenientes de 50 fêmeas, sendo obtidas aleatoriamente cinco fêmeas em cada um dos 10 dias de coleta.

Para a avaliação da concentração de IGF-I livre presente no FFPs, FFGs e no sangue foi utilizado um delineamento em blocos casualizados com três tratamentos (FFGs, FFPs e sangue). Os blocos foram constituídos pelos dias de coleta. No total foram realizadas 10 repetições sendo cada parcela experimental representada por 50 fêmeas.

Análise estatística

Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Foi realizado teste de normalidade (*Kolmogorov-Smirnov*) e, posteriormente, os dados submetidos à análise não paramétrica, visto que não atingiram a normalidade. Para a avaliação do número de folículos ovarianos as médias dos tratamentos (FPs e FGs) foram comparadas entre si pelo teste Mann-Whitney. Para a

avaliação dos níveis de IGF-I entre os FFPs, FFGs e séricos, as médias dos tratamentos foram comparadas entre si pelo teste Mann-Whitney quando significativo ao teste Kruskal-Wallis. Foi considerado um nível de significância de 5% para estabelecer diferença estatística. Toda a análise estatística foi realizada por meio do pacote estatístico *SPSS for Windows* versão 17.0 (SPSS Statistics 17.0, Rel. 17.0.1. SPSS Inc, Chicago, IL, 2008).

Resultados

Na avaliação da morfometria ovariana, o comprimento maior e menor médio dos ovários foi de $26,0 \pm 3,0$ mm e $19,0 \pm 2,0$ mm, respectivamente. Observou-se que o número de FPs foi maior ($p < 0,01$) em comparação com os FGs (Tabela 1).

Tabela 1 Número (média \pm desvio-padrão) de folículos pequenos (FPs) e grandes (FGs) encontrados na superfície ovariana de fêmeas suínas pré-púberes (n = 100 ovários)

Tratamento†	Número de folículos*	Mínimo	Máximo
Folículos pequenos (FPs)	$70,86 \pm 25,76$ a	13	154
Folículos grandes (FGs)	$6,54 \pm 5,26$ b	0	26
Média Geral	$38,70 \pm 37,19$		
$p < 0,01$			

*Médias seguidas de diferentes letras na coluna diferem pelo teste Mann-Whitney ($p < 0,01$).

†FPs, 2 a 5 mm de diâmetro e FGs, 6 a 10 mm de diâmetro.

A concentração de IGF-I livre foi maior ($p < 0,05$) no FFGs quando comparado com as do FFPs e do sangue (Tabela 2 e Fig. 1). Os FFGs ($170,92 \pm 88,29$ ng/mL) apresentaram níveis 2,6 e 2,4 vezes maiores ($p < 0,05$) de IGF-I livre que os FFPs ($67,39 \pm 49,90$ ng/mL) e o sangue ($73,48 \pm 34,63$ ng/mL), respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 Níveis ovarianos e sanguíneos de IGF-I (ng/mL) em fêmeas suínas pré-púberes (n = 500)

Variável analisada	Fluido Folicular†		Sangue	Valor de p
	FPs	FGs		
IGF-I*	$67,39 \pm 49,90$ b	$170,92 \pm 88,29$ a	$73,48 \pm 34,63$ b	0,04

*Médias seguidas de diferentes letras na linha diferem pelo teste Mann-Whitney ($p < 0,05$).

†FPs, folículos pequenos (2 a 5 mm de diâmetro) e FFGs, folículos grandes (6 a 10 mm de diâmetro).

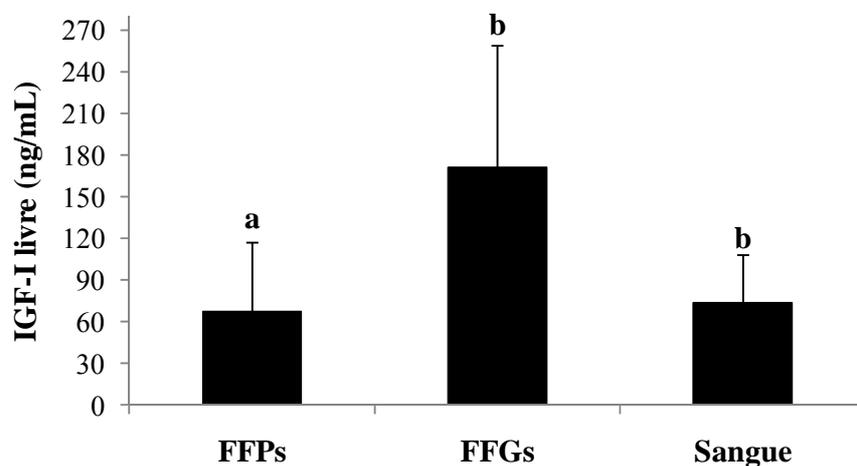


Fig. 1 Concentração de IGF-I livre no FF coletado a partir de folículos pequenos (FFPs, 2 a 5 mm de diâmetro), folículos grandes (FFGs, 6 a 10 mm de diâmetro) e sangue de fêmeas suínas pré-púberes (n = 500).

^{a,b}Médias sem o sobrescrito comum diferem pelo teste Mann-Whitney ($p = 0,04$).

Discussão

O presente estudo descreveu a morfometria ovariana (tamanho ovariano e número de folículos) de fêmeas suínas pré-púberes e também determinou os níveis de IGF-I livre presente no FF de folículos ovarianos de dois diferentes diâmetros.

A morfologia dos ovários obtidos apresentou, em sua maioria, característica de animais pré-púberes, ou seja, ovários sem a presença de corpo albicans, corpo lúteo ou sinais de ovulação (Bagg et al., 2004; Knox, 2005). Esse achado pode ser confirmado pelo maior número de folículos pequenos (menores que 5 mm de diâmetro) na superfície dos ovários.

Os resultados da morfometria ovariana foram semelhantes aos obtidos por Bagg et al. (2004), que encontraram média de 24,1 mm para o comprimento maior e 15,9 mm para o comprimento menor de ovários de fêmeas suínas pré-púberes da mesma raça utilizada no presente estudo. Com relação ao número de folículos na superfície ovariana, um maior número de FPs em comparação com FGs é justificado, pois em fêmeas suínas pré-púberes, os folículos superficiais abaixo de 6 mm estão abundantemente presentes, em detrimento a folículos maiores e a estruturas lúteas (Knox, 2005).

O número médio de FPs obtidos no presente estudo apresentou semelhança aos dados descritos por Knox (2005), que obtiveram média de 80 folículos pequenos nos ovários de fêmeas suínas. A média geral do número de folículos ovarianos (folículos entre 2 e 10 mm) foi próxima aos resultados obtidos por Bagg et al. (2004), que avaliaram o número de folículos ovarianos superficiais também em fêmeas pré-púberes (46,8).

As concentrações de IGF-I obtidas diferem das demonstradas por Hammond et al. (1985) em folículos maiores de 6 mm de diâmetro, que descreveram níveis médios de 104 ng/mL. Isso pode ser justificado pelo reduzido número de animais utilizado em seu estudo (nove animais) quando comparado ao presente estudo e também pelo método de avaliação das concentrações de IGF-I, que foi por meio de radioimunoensaio.

De acordo com Spicer et al. (2005), o aumento da concentração de IGF-I durante o desenvolvimento folicular demonstra que os níveis desse hormônio são fisiologicamente regulados por meio de um controle ovariano parácrino e autócrino. Porém, mais estudos são necessários para avaliar se as alterações de IGF-I no FF decorrem exclusivamente por uma alteração de produção local do IGF-I ou devido a mudanças na transudação a partir do soro sanguíneo.

Em geral, as concentrações de IGF-I no FF são iguais ou menores em relação ao sangue (Spicer e Echtenkamp, 1995). Entretanto, um aumento na

concentração folicular de IGF-I livre, ou biodisponível, desempenha um papel na diferenciação folicular por meio de uma ação na potencialização das gonadotrofinas (Spicer et al., 2005). Portanto, com o desenvolvimento folicular é esperado um elevado nível de IGF-I no FFGs em comparação com o sangue. Fato demonstrado no presente estudo, no qual observou-se que a concentração de IGF-I foi semelhante entre o FFPs e o sangue, porém maior no FFGs.

No presente estudo foi demonstrado que as concentrações de IGF-I livre em FGs são maiores do que em folículos menores que 5 mm de diâmetro. Esses achados corroboram com os dados descritos em bovinos (Santiago et al., 2005) e equinos (Spicer et al., 2005), durante o crescimento folicular.

Dessa forma, a determinação dos níveis fisiológicos de IGF-I livre nos FPs e FGs de fêmeas suínas pré-púberes, conforme demonstrado no presente estudo poderá ser útil no auxílio de futuras pesquisas relacionadas à PIV de embriões suínos com a adição desse hormônio. Além disso, tendo em vista que o número de FPs é elevado no ovário de fêmeas suínas (Bagg et al., 2004; Knox, 2005) e conforme demonstrado no presente estudo, o uso do FF proveniente dos mesmos nos protocolos de MIV e FIV com a adição de IGF-I poderá ser uma alternativa interessante para melhorar a eficiência da técnica.

Com relação à metodologia empregada para a avaliação dos níveis de IGF-I livre, ainda não existe um consenso. Atualmente, os testes predominantes utilizados para a avaliação do IGF-I incluem a ultra-filtração por centrifugação e imunoenaios diretos baseados em anticorpos para IGF-I não ligado (Frystyk, 2004). A avaliação por imunoensaio direto apresenta a mesma sensibilidade em relação à ultra-filtração, porém, a ultra-filtração apresenta um maior coeficiente de variação, pois requer dois passos em sua análise, a ultra-filtração e posteriormente o imunoensaio. Assim, ambos os passos contribuem para a imprecisão do resultado (Frystyk et al., 2001). Por outro lado, o imunoensaio

direto é tecnicamente menos exigente e trabalhoso, além de permitir a determinação do IGF-I em grande escala e em um número elevado de amostras.

Apesar dessas vantagens, o imunoenensaio direto pode fornecer resultados superestimados da concentração de IGF-I livre, pois, durante o tempo de incubação da amostra, o anticorpo irá exaurir o IGF-I livre (antígeno) e, inevitavelmente promover a dissociação do complexo IGF-I/IGFPB (Frystyk, 2004). Portanto, o tempo de incubação da amostra a ser analisada deve seguir estritamente o estipulado pelo fabricante. Além disso, a temperatura também pode interferir no resultado do ensaio. Diante desse fato, ao se determinar a concentração de IGF-I por meio de imunoenensaio direto, é descrito que na verdade obtém-se a soma do IGF-I livre e do IGF-I facilmente dissociável.

Nesse estudo, foi utilizado um kit de imunoenensaio específico para determinação do IGF-I livre no soro e em qualquer fluido biológico de suínos. Apesar das possíveis alterações que as amostras avaliadas no presente estudo poderiam sofrer diante dos aspectos abordados anteriormente, tomou-se cuidado de seguir corretamente o protocolo de análise estabelecido pelo fabricante e, além disso, para reduzir o erro foi realizada análise em triplicata de cada uma das amostras.

O presente estudo fornece novas perspectivas em torno das concentrações fisiológicas de IGF-I livre encontrada em folículos ovarianos de diferentes tamanhos, uma vez que há pouca informação na literatura sobre valores fisiológicos desse hormônio livre para fêmeas suínas pré-púberes. Nesse contexto foi possível observar que durante o desenvolvimento folicular em suínos, a concentração de IGF-I livre intrafolicular aumenta, sendo este fato relacionado a uma maior atividade dos FGs e a diferenciação que os mesmos sofrem durante o desenvolvimento para a ovulação.

Dessa forma, o presente estudo permite concluir que no FFGs, a concentração de IGF-I livre é maior (aproximadamente 2,6 vezes) em relação às

concentrações no FFPs. No entanto, fêmeas suínas pré-púberes apresentam uma elevada população de folículos ovarianos abaixo de 5 mm de diâmetro. Assim, estudos envolvendo a adição de IGF-I e FFPs aos meios de MIV e FIV de suínos podem ser realizados a partir do conhecimento das concentrações fisiológicas do hormônio no FF, para então avaliar o potencial desse hormônio e do FFPs em aumentar a eficiência da PIV de embriões em suínos.

Agradecimentos

À Profª. Drª. Antônia dos Reis Figueira (DFP/UFLA) e a Senhora Luciana de Paiva Godinho (DFP/UFLA) pela generosa ajuda com o leitor de microplacas fornecido para o ensaio ELISA e também a equipe do “Matadouro/Frigorífico NUTRILI” por terem fornecido todo material biológico utilizado nesse trabalho. O estudo também foi apoiado financeiramente pelo CNPq, CAPES (PNPD Institucional e Pró-equipamentos 2010), FAPEMIG (SHA-APQ-02548-10), Departamentos de Medicina Veterinária e Zootecnia e Programas de Pós-graduação em Zootecnia e Ciências Veterinárias da UFLA.

Referências

Algriany, O.; Bevers, M.; Schoevers, E.; Colenbrander, B.; Dieleman, S., 2004: Follicle size-dependent effects of sow follicular fluid on *in vitro cumulus* expansion, nuclear maturation and blastocyst formation of sow *cumulus* oocytes complexes. *Theriogenology* **62**, 1483–1497.

Asano, A.; Niwa, K., 2004: Activation and penetration *in vitro* of pig oocytes treated with calcium ionophore. *The Journal of Reproduction and Development* **50**, 77–85.

Bagg, M.A.; Vassena, R.; Papasso-Brambilla, E.; Grupen, C.G.; Armstrong, D.T.; Gandolfi, F., 2004: Changes in ovarian, follicular, and oocyte morphology immediately after the onset of puberty are not accompanied by an increase in oocyte developmental competence in the pig. *Theriogenology* **62**, 1003–1011.

Bolamba, D.; Sirard, M.A., 2000: Ovulation and follicular growth in gonadotropin-treated gilts followed by *in vitro* fertilization and development of their oocytes. *Theriogenology* **53**, 1421–1437.

Chatterjee, A.; Harrison, C.J.; Britt, W.J.; Bewtra, C., 2001: Modification of maternal and congenital cytomegalovirus infection by anti-glycoprotein b antibody transfer in guinea pigs. *The Journal of Infectious Diseases* **183**, 1547–1553.

Clarke, H.G.; Hope, S.A.; Byers, S.; Rodgers, R.J., 2006: Formation of ovarian follicular fluid may be due to the osmotic potential of large glycosaminoglycans and proteoglycans. *Reproduction* **132**, 119–131.

Coy, P.; Romar, R., 2002: *In vitro* production of pig embryos: a point of view. *Reproduction, Fertility, and Development* **14**, 275–286.

Coy, P.; Grullón, L.; Cánovas, S.; Romar, R.; Matás, C.; Avilés, M., 2008: Hardening of the zona pellucida of unfertilized eggs can reduce polyspermic fertilization in the pig and cow. *Reproduction* **135**, 19–27.

Cui, X.S.; Jeong, Y.J.; Jun, J.H.; Kim, N.H., 2005: Insulin-like growth factor-I alters apoptosis related genes and reduces apoptosis in porcine parthenotes developing *in vitro*. *Theriogenology* **63**, 1070–1080.

Daftary, S.S.; Gore, A.C., 2005: IGF-1 in the brain as a regulator of reproductive neuroendocrine function. *Experimental Biology and Medicine* **230**, 292–306.

Frystyk, J.; Ivarsen, P.; Støving, R.K.; Dall, R.; Bek, T.; Hagen, C.; Ørskov, H., 2001: Determination of free insulin-like growth factor-I in human serum: comparison of ultrafiltration and direct immunoradiometric assay. *Growth Hormone & IGF Research* **11**, 117–127.

Frystyk, J., 2004: Free insulin-like growth factors -- measurements and relationships to growth hormone secretion and glucose homeostasis. *Growth Hormone & IGF Research* **14**, 337–375.

Gruppen, C.G.; Nagashima, H.; Nottle, M.B., 1997: Role of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on porcine oocyte maturation and embryonic development *in vitro*. *Reproduction, Fertility, and Development* **9**, 571–575.

Hammond, J.M.; Baranao, J.L.; Skaleris, D.; Knight, A.B.; Romanus, J.A.; Rechler, M.M., 1985: Production of insulin-like growth factors by ovarian granulosa cells. *Endocrinology* **117**, 2553–2555.

Higashi, Y.; Sukhanov, S.; Anwar, A.; Shai, S.Y.; Delafontaine, P., 2012: Aging, atherosclerosis, and IGF-1. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* **67**, 626–639.

Howard, H.J.; Ford, J.J., 1992: Relationships among concentrations of steroids, inhibin, insulin-like growth factor-1 (IGF-1), and IGF-binding proteins during follicular development in weaned sows. *Biology of Reproduction* **47**, 193–201.

Illera, M.J.; Lorenzo, P.L.; Illera, J.C.; Petters, R.M., 1998: Developmental competence of immature pig oocytes under the influence of EGF, IGF-I, follicular fluid and gonadotropins during IVM-IVF processes. *The International Journal of Developmental Biology* **42**, 1169–1172.

Ito, M.; Iwata, H.; Kitagawa, M.; Kon, Y.; Kuwayama, T.; Monji, Y., 2008: Effect of follicular fluid collected from various diameter follicles on the progression of nuclear maturation and developmental competence of pig oocytes. *Animal Reproduction Science* **106**, 421–430.

Kim, S.; Lee, G.S.; Lee, S.H.; Kim, H.S.; Jeong, Y.W.; Kim, J.H.; Kang, S.K.; Lee, B.C.; Hwang, W.S., 2005: Embryotropic effect of insulin-like growth factor (IGF)-I and its receptor on development of porcine preimplantation embryos produced by *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Molecular Reproduction and Development* **72**, 88–97.

Knox, R.V., 2005: Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. *Domestic Animal Endocrinology* **29**, 385–397.

Mao, J.; Smith, M.F.; Rucker, E.B.; Wu, G.M.; McCauley, T.C.; Cantley, T.C.; Prather, R.S.; Didion, B.A.; Day, B.N., 2004: Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis *in vitro*. *Journal Animal Science* **82**, 1967–1975.

Monget, P.; Fabre, S.; Mulsant, P.; Lecerf, F.; Elsen, J.M.; Mazerbourg, S.; Pisselet, C.; Monniaux, D., 2002: Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology* **23**, 139–154.

Park, C.H.; Lee, S.G.; Choi, D.H.; Lee, C.K., 2009: A modified swim-up method reduces polyspermy during *in vitro* fertilization of porcine oocytes. *Animal Reproduction Science* **115**, 169–181.

Pawshe, C.H.; Rao, K.B.; Totey, S.M., 1998: Effect of insulin-like growth factor I and its interaction with gonadotropins on *in vitro* maturation and embryonic development, cell proliferation, and biosynthetic activity of *cumulus*-oocyte complexes and granulosa cells in buffalo. *Molecular Reproduction and Development* **49**, 277–285.

Reed, M.L.; Estrada, J.L.; Illera, M.J.; Petters, R.M., 1993: Effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor-I, and dialyzed porcine follicular fluid on porcine oocyte maturation *in vitro*. *The Journal of Experimental Zoology* **266**, 74–78.

Rhind, S.M.; Schanbacher, B.D., 1991: Ovarian follicle populations and ovulation rates of Finnish Landrace cross ewes in different nutritional states and associated profiles of gonadotrophins, inhibin, growth hormone (GH) and insulin-like growth factor-I. *Domestic Animal Endocrinology* **8**, 281–291.

Samaras, S.E.; Hagen, D.R.; Bryan, K.A.; Mondschein, J.S.; Canning, S.F.; Hammond, J.M., 1994: Effects of growth hormone and gonadotropin on the insulin-like growth factor system in the porcine ovary. *Biology of Reproduction* **50**, 178–186.

Santiago, C.A.; Voge, J.L.; Aad, P.Y.; Allen, D.T.; Stein, D.R.; Malayer, J.R.; Spicer, L.J., 2005: Pregnancy-associated plasma protein-A and insulin-like growth factor binding protein mRNAs in granulosa cells of dominant and subordinate follicles of preovulatory cattle. *Domestic Animal Endocrinology* **28**, 46–63.

Spicer, L.J.; Echterkamp, S.E., 1995: The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology* **12**, 223–245.

Spicer, L.J.; Santiago, C.A.; Davidson, T.R.; Bridges, T.S.; Chamberlain, C.S., 2005: Follicular fluid concentrations of free insulin-like growth factor (IGF)-I during follicular development in mares. *Domestic Animal Endocrinology* **29**, 573–581.

Vatzias, G.; Hagen, D.R., 1999: Effects of porcine follicular fluid and oviduct-conditioned media on maturation and fertilization of porcine oocytes *in vitro*. *Biology of Reproduction* **60**, 42–48.

Xia, P.; Tekpetey, F.R.; Armstrong, D.T., 1994: Effect of IGF-I on pig oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development *in vitro*, and on granulosa and cumulus cell biosynthetic activity. *Molecular Reproduction and Development* **38**, 373–379.

ARTIGO 2

Influência do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I na maturação e fertilização *in vitro* de ovócitos suínos utilizando fluido folicular proveniente de foliculos ovarianos de diferentes diâmetros

Artigo segue as normas e formato do periódico *Theriogenology** ao qual foi submetido.

*Este artigo é uma versão preliminar, considerando que o conselho editorial da revista poderá sugerir alterações para adequá-lo ao seu próprio estilo.

Influência do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I na maturação e fertilização *in vitro* de ovócitos suínos utilizando fluido folicular proveniente de folículos ovarianos de diferentes diâmetros

Guilherme Oberlender^{a,*}, Luis David Solis Murgas^a, Márcio Gilberto Zangeronimo^a, Tila de Alcantara Menezes^a, Thais Preisser Pontelo^a, Adriana Cristina da Silva^a, Luis Alberto Vieira^b

^aDepartamento de Medicina Veterinária, Setor de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, Caixa Postal 3037.

Lavras, Minas Gerais, Brasil

^bDepartamento de Fisiologia, Faculdade de Veterinária, Universidade de Murcia, Murcia 30071, Espanha. Tel: 34 868-884309; Fax: 44 2075862870. E-mail: tuncan24@yahoo.es

*Autor para correspondência. Tel: +55 35 3829 1148; Fax: +55 35 3829 1148.
Endereço de E-mail: *guilherme_oberlender@yahoo.com.br (G. Oberlender)

Resumo

Objetivou-se avaliar o efeito da adição de IGF-I e sua interação com fluido folicular (FF) proveniente de folículos pequenos (FFPs, 2 a 5 mm de diâmetro) e grandes (FFGs, 6 a 10 mm de diâmetro) suplementados ao meio de MIV de ovócitos suínos sobre a progressão da maturação nuclear e taxas de penetração, monospermia, formação de pronúcleos, número de espermatozoides aderidos à zona pelúcida, número de espermatozoides por ovócito penetrado e a eficiência da fertilização. Ovócitos foram obtidos de ovários de fêmeas pré-púberes (5 a 6 meses/peso aproximado de 100 kg) imediatamente após o abate em Matadouro/Frigorífico e maturados em meio NCSU-37 suplementado com

10% de FF (FFPs e FFGs) e várias concentrações de IGF-I (0, 60, 120, 180 e 240 ng/mL). Após a MIV, os ovócitos foram fertilizados, cultivados por um período de 18 horas e depois fixados em solução Hoechst a 1% para avaliação dos resultados de maturação e fertilização. A MIV foi maior ($P < 0,01$) com o uso de FFGs no grupo controle e quando adicionado de 60 ng/mL de IGF-I. Observou-se efeito quadrático ($P < 0,01$) do IGF-I com o uso de FFPs. Entretanto, efeito linear decrescente ($P < 0,01$) foi obtido do IGF-I quando os ovócitos foram maturados com FFGs. A penetração não diferiu ($P > 0,05$) entre os ovócitos maturados com FFPs e FFGs quando utilizado 60 e 180 ng/mL de IGF-I. A monospermia foi semelhante ($P > 0,05$) nos diferentes tipos de FF apenas com a adição de 120 ng/mL de IGF-I. Já para a eficiência da FIV, as doses de 120 e 180 ng/mL do hormônio não diferiram ($P > 0,05$) entre o FFPs e FFGs. Não houve efeito ($P > 0,05$) do IGF-I com o uso de FFGs sobre os resultados da FIV. Por outro lado, quando utilizado FFPs, houve efeito quadrático ($P < 0,01$) do IGF-I sobre a penetração, monospermia e eficiência da FIV. Houve diferença ($P = 0,01$) na formação de pró-núcleos apenas entre os FFPs e FFGs. O número de espermatozoides penetrados por ovócito e aderidos à zona pelúcida foi semelhante ($P > 0,05$) com o uso dos dois tipos de FF e doses de IGF-I. A partir das equações obtidas para o uso de IGF-I com FFPs, pode-se sugerir que a adição de IGF-I entre 129 e 179 ng/mL ao meio de MIV promove resultados semelhantes aos obtidos com o uso de FFGs. Assim, a adição de IGF-I ao meio de MIV com o uso de FFPs aumenta a maturação e melhora os resultados de FIV. O IGF-I não apresenta efeito na MIV e FIV com o uso de FFGs. Esses achados fornecem evidência que o IGF-I desempenha importante função na MIV e FIV de ovócitos suínos quando da utilização de FFPs.

Palavras-chave: Espermatozóides; Fertilização *in vitro*; Fluido folicular; Foliculos; IGF-I; Maturação *in vitro*; Reprodução; Suíno

1. Introdução

Na produção *in vitro* (PIV) de embriões suínos, os atuais sistemas de maturação *in vitro* (MIV) e fertilização *in vitro* (FIV) são caracterizados por apresentarem baixas taxas de desenvolvimento embrionário [1,2] e um dos principais fatores que comprometem a eficiência da técnica são as condições dos meios de cultivo [3]. Acredita-se que a maturação incompleta dos ovócitos seja um dos principais fatores responsáveis pela baixa taxa de sucesso [2,4,5]. Por outro lado, o desenvolvimento de embriões produzidos a partir de ovócitos maturados *in vivo* apresenta melhores resultados do que *in vitro* [6]. Portanto, isso sugere que os atuais sistemas de MIV são deficientes em fatores que facilitariam a completa maturação citoplasmática dos ovócitos, como ocorre *in vivo*.

O fluido folicular (FF) é uma substância comumente adicionada ao meio de MIV de suínos, tendo a capacidade de aumentar a taxa de maturação, a formação de pró-núcleos masculinos e a fertilização monospérmica [7,8]. No FF podem ser encontrados fatores de crescimento [9], aminoácidos [10], hormônios [11], dentre outras substâncias que são benéficas à maturação e fertilização ovocitária. Além disso, a maturação é influenciada não apenas pela presença do FF como também pelo tamanho dos folículos dos quais o fluido é coletado [12], uma vez que pode haver diferenças na quantidade das substâncias e fatores presentes em diferentes tamanhos de folículos, levando assim a distintos resultados de MIV e FIV [8,13]. Portanto, a eficácia desses fatores sobre a capacidade de desenvolvimento ovocitário pode ser influenciada pela fonte de FF, folículos pequenos ou grandes [8], sendo que ainda tem sido avaliado o papel da fonte de FF na progressão da maturação nuclear e na fertilização.

No que diz respeito aos ovários das fêmeas suínas pré-púberes, que são rotineiramente utilizados para a PIV de embriões [1], há um elevado número de

folículos pequenos (abaixo de 5,0 mm) [14,15]. Desta forma, a obtenção de FF a partir de folículos grandes (acima de 5 a 6 mm de diâmetro) é limitada pelo pequeno número desses nos ovários. Portanto, estudos que avaliem novas técnicas que viabilizem o uso de FF obtido a partir de folículos pequenos adicionados ou não de outras substâncias/fatores na MIV são necessários na tentativa de maximizar a técnica, além de representar grande avanço na PIV de embriões suínos.

O papel dos fatores de crescimento presentes no FF sobre a maturação ovocitária tem recebido muita atenção. Dentre esses, o fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) é um dos mais estudados como reguladores da função ovariana [2,16]. O IGF-I está presente no FF e é sintetizado pelas células da granulosa [17]. Atua promovendo o crescimento e diferenciação dessas células e dos folículos pré-antrais, além de promover a formação do antro folicular e também a produção de esteróides [18,19].

O uso do IGF-I na PIV de embriões tem sido descrito em suínos [2,6,20–23], bovinos [24,25] e búfalos [19,26]. Em suínos, até o momento, o papel do IGF-I na MIV permanece incerto, pois os resultados são muito divergentes. Além disso, a maioria dos trabalhos avaliou a adição desse hormônio nos meios de cultivo e produção de embriões, sendo o seu papel nas várias etapas individuais da PIV de embriões, principalmente na maturação e fertilização, pouco avaliado.

Diante do exposto, objetivou-se avaliar o efeito da adição de IGF-I e FF obtido de folículos de dois diferentes diâmetros ao meio de MIV, sobre a progressão da maturação ovocitária e as taxas de FIV em suínos.

2. Materiais e métodos

2.1. Ética

O experimento foi realizado após a aprovação institucional da Universidade Federal de Lavras (UFLA), sendo todo protocolo experimental conduzido de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais dessa instituição sob o protocolo número 009/10.

2.2. Local de realização e animais

O experimento foi realizado no laboratório de fertilização *in vitro* e cultivo de embriões de suínos, localizado no Departamento de Medicina Veterinária da UFLA. Todo material biológico foi obtido em abatedouro comercial (“Matadouro/Frigorífico NUTRILI”) situado na cidade de Lavras, Minas Gerais, Brasil, durante os meses de maio a outubro de 2012. Foram utilizados ovários de fêmeas suínas pré-púberes Landrace × Large White (linhagem híbrida comercial – Genética AGROCERES) com idade entre cinco a seis meses e peso médio entre 90 a 100 kg.

2.3. Reagentes e meios de cultivo utilizados

Salvo qualquer indicação em contrário, todos os produtos e reagentes utilizados nesse estudo foram adquiridos da Empresa Sigma-Aldrich Química S.A. (São Paulo, Brasil).

O meio básico para a MIV foi o *North Carolina State University-37* (NCSU-37) [27] suplementado com 0,57 mM de cisteína, 50µM de β-

mercaptoetanol, 0,0005% de insulina, 1,0 mM de dibutiril AMPc, 10 UI/mL de hCG (Chorulon[®], Intervet International B.V., Boxmeer, Holanda), 10 UI/mL de PMSG (Folligon[®], Intervet International B.V., Boxmeer, Holanda) [28,29] e as combinações de FF suíno a 10% (v:v) e IGF-I humano recombinante de acordo com o desenho experimental.

O meio básico utilizado para a FIV, meio TALP (Tyrode's Albumina Lactato Piruvato), foi o mesmo utilizado por Rath et al. [30] suplementado com 1,1 mM de piruvato sódico e 0,3% de soro albumina bovina (BSA) livre de ácidos graxos [28].

Todos os meios utilizados foram preparados com o uso de água ultrapura, Milli-Q, 18,2 M Ω cm⁻¹ (Direct-Q 5, Millipore, Darmstadt, Alemanha) e previamente incubados a temperatura de 38,5°C em incubadora a 5% de CO₂ e 100% de umidade por três horas antes de serem utilizados.

2.4. Coleta e preparação do fluido folicular

Ovários foram obtidos de fêmeas pré-púberes imediatamente após o abate e transportados para o laboratório, em recipiente térmico, contendo solução de NaCl 0,9% (p:v) adicionada de 0,1% de sulfato de kanamicina à temperatura de 37°C. O tempo decorrido desde o abate dos animais até a obtenção do FF não excedeu quatro horas.

Com o uso de uma agulha 18G e uma seringa de 10 mL descartável foi aspirado o FF a partir dos folículos antrais localizados na superfície de cada ovário. Os folículos foram divididos em duas categorias: folículos pequenos (FPs, 2 a 5 mm de diâmetro) e folículos grandes (FGs, 6 a 10 mm de diâmetro). Uma vez aspirado (71 FPs e 7 FGs, em média de cada ovário), o *pool* de FF de cada uma das categorias foi centrifugado a 1.500 \times g por 30 minutos a 24°C para remoção de células e debris. Em seguida, o sobrenadante obtido foi coletado,

filtrado e esterilizado em filtros de membrana de 0,22 μm (Millex-GP, Merck Millipore, Massachusetts, Estados Unidos), aliquotados em microtubos de 1,0 mL e imediatamente armazenados a -20°C até a utilização [31]. Durante o processo de aspiração dos folículos, os ovários permaneceram em béquer de vidro (1.000 mL) imersos em solução salina adicionada com 0,1% de sulfato de kanamicina sobre placa aquecedora a 37°C .

2.5. Coleta e seleção dos ovócitos

Os ovários coletados de cada uma das fêmeas pré-púberes foram obtidos imediatamente após o abate e transportados para o laboratório, em recipiente térmico, dentro de uma hora, contendo solução de NaCl 0,9% (w:v) adicionada de 0,1% de sulfato de kanamicina à temperatura de 37°C . Em seguida, os ovários foram lavados três vezes em solução de cetrimida (brometo de hexadeciltrimetilamônio) 0,04% v:v e mais três vezes em solução salina, ambas a 37°C . Os complexos de células do *cumulus*-ovócito (COCs) foram coletados por aspiração dos folículos antrais superficiais, de 3 a 6 mm de diâmetro, com o uso de agulha 18G acoplada a seringa descartável de 10 mL. Em seguida, o FF obtido foi depositado em tubos de ensaio de 15,0 mL e permaneceram por 10 a 15 minutos em repouso sob placa aquecedora a 37°C para que os COCs sedimentassem. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* obtido depositado sob placa de Petri 90×15 mm para o processo de seleção dos COCs a serem utilizados para a MIV.

A seleção dos ovócitos foi realizada com auxílio de microscópio estereoscópico (Q740SZ-TR Quimis, Diadema, São Paulo, Brasil). Foram obtidos apenas COCs intactos, dentro de duas horas após o abate [32], com citoplasma homogêneo, ooplasma uniforme e uma completa e densa camada de células da granulosa (células do *cumulus* não expandida, ovócitos rodeados por

no mínimo três camadas de células da granulosa). Ovócitos com anormalidades morfológicas (citoplasma de cor castanha, apresentando-se retraído ou granulado e membranas citoplasmáticas indistinguíveis) foram excluídos [33].

Após a seleção, os ovócitos foram depositados em placas de Petri 35 × 10 mm e lavados seguidamente três vezes em solução tampão fosfato salino de *Dulbecco's* (DPBS) suplementada com 0,001% de álcool polivinílico (PVA) e 0,0005% de roxo fenol. Em seguida, os COCs foram lavados mais três vezes no meio de MIV previamente equilibrado.

2.6. *Maturação in vitro (MIV) dos ovócitos*

Grupos de 35 COCs foram transferidos para microplacas de cultura celular de quatro poços (SPL Life Science Inc., Pocheon-si, Gyeonggi-do, Coréia do Sul) e cultivados por 22 horas, em incubadora a 38,5°C, 5% de CO₂ e 100% de umidade [34], em 500 µL do meio NCSU-37 suplementado com hormônios, dibutilil AMPc, FF (oriundo de folículos pequenos, FFPs e folículos grandes, FFGs) e diferentes combinações de IGF-I. Após esse tempo inicial de cultivo, os ovócitos foram lavados e transferidos para microplacas de cultura com meio de maturação sem a suplementação de hormônios e dibutilil AMPc e novamente cultivados por mais 22 horas antes da fertilização [35,36]. A adição de IGF-I também foi realizada nas últimas 22 horas de maturação.

Baseado em experimento prévio realizado por nossa equipe (Oberlender et al., dados não publicados), as concentrações de IGF-I adicionadas ao meio de MIV foram de 0, 60, 120, 180 e 240 ng/mL, correspondentes a 0, 50, 100, 150 e 200% dos níveis fisiológicos médios determinados em folículos ovarianos pequenos (FPs) e grandes (FGs).

2.7. Coleta de sêmen e preparação espermática

Amostras de sêmen utilizadas para a FIV foram provenientes de um reprodutor suíno adulto, da raça Duroc, maduro sexualmente e de fertilidade comprovada, sendo as coletas realizadas pela técnica da mão enluvada [37]. Em cada coleta, foi obtida a fração rica do ejaculado e imediatamente transportada ao laboratório em condições estéreis e protegido da luz. Todos os ejaculados apresentaram padrões considerados normais (média \pm desvio-padrão) para o sêmen suíno (motilidade: $86,7 \pm 5,2\%$ e total de anormalidades morfológicas: $10,7 \pm 4,0\%$) [38]. Após avaliação inicial, as amostras de sêmen foram diluídas 1:1 em BTS[®] – *Beltsville Thawing Solution* (MINITÜB Abfüll- und Labortechnik GmbH & Co. KG, Tiefenbach, Alemanha) [39] e mantidas a temperatura ambiente (24°C) por duas horas.

Para a preparação espermática para a FIV, os espermatozoides foram separados e selecionados do sêmen diluído a partir da sedimentação através de duas colunas do gradiente de densidade Percoll (90 e 45%, v:v) [40]. A preparação utilizou uma alíquota de 0,5 mL do sêmen diluído sobre duas descontínuas camadas do gradiente Percoll [41] em um tubo de ensaio de 15 mL. Em seguida, centrifugou-se a $700 \times g$ por 30 minutos a 24°C. Posteriormente, o *pellet* espermático obtido, por meio da remoção das camadas do sobrenadante por aspiração, foi novamente ressuscitado em meio TALP [30] previamente equilibrado e lavado por centrifugado a $700 \times g$ por 10 minutos a 24°C [42]. Finalmente, o *pellet* resultante foi ressuscitado em meio TALP até atingir a concentração de $2,8 \times 10^5$ espermatozoides/mL [43] determinada por meio de fotômetro *Spermacue*[™] (MINITÜB Abfüll- und Labortechnik GmbH & Co. KG, Tiefenbach, Alemanha).

2.8. Fertilização *in vitro* (FIV)

Após a MIV (44 horas de cultivo), os ovócitos foram separados mecanicamente das células da granulosa aderidas por meio de uma cuidadosa pipetagem/aspiração até a completa desnudação dos ovócitos. Os ovócitos livres das células do *cumulus* foram lavados três vezes em meio TALP e após grupos de 35 ovócitos/poço foram transferidos para microplacas de cultura celular de quatro poços contendo 250 μ L do meio de FIV previamente equilibrado.

Para a fertilização, 250 μ L da suspensão espermática previamente preparada foram adicionados a cada poço contendo os ovócitos em uma taxa final de 2.000:1 (espermatozoides:ovócito) [38]. Em seguida, os espermatozoides e ovócitos foram coincubados em incubadora a temperatura de 38,5°C, 5% de CO₂ e 100% umidade do ar por um período de duas horas e meia. Posteriormente, os ovócitos foram lavados em meio TALP fresco por meio de cuidadosa pipetagem com pipeta de Pasteur de vidro, com posterior continuação do cultivo dentro de incubadora até atingir um tempo total de 18 horas.

2.9. Avaliação dos resultados da FIV

Os presumíveis zigotos (18 horas após a fertilização) foram fixados em solução de glutaraldeído em PBS a 0,5% por 30 minutos. Subsequentemente foram corados por 15 minutos com solução de Hoechst 33342 a 1% em PBS, lavados em solução PBS, depositados sobre lâminas de vidro e posteriormente examinados em microscópio de Epifluorescência (Zeiss Axio Observer.Z1, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Alemanha) em aumento de 400 \times para a evidência da penetração espermática e formação pronuclear.

A taxa de maturação ovocitária, taxa de penetração, taxas de monospermia, taxa de formação de pronúcleos, número de espermatozoides

aderidos à zona pelúcida, número de espermatozoides por ovócito penetrado e eficiência da fertilização foram avaliadas [38,43]. A maturação foi avaliada como a porcentagem de ovócitos que atingiram a metáfase II da segunda divisão meiótica e que se apresentavam penetrados ou não por espermatozoides. A taxa de penetração foi avaliada como a porcentagem de ovócitos maturados que estavam penetrados por um ou mais espermatozoides. A monospermia foi avaliada como a porcentagem de ovócitos maturados e penetrados por apenas um espermatozoide e a taxa de formação de pró-núcleos como a porcentagem de ovócitos monospermicos que apresentaram pró-núcleo masculino e feminino. A eficiência da fertilização foi definida como a porcentagem de ovócitos monospermicos com dois pró-núcleos em relação ao total de ovócitos fertilizados.

2.10. Desenho experimental

Para a avaliação dos efeitos da suplementação do meio de MIV com FF suíno derivado de FPs e FGs e também da adição de diferentes concentrações de IGF-I exógeno foi utilizado um delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial 5×2 (cinco níveis de IGF-I e dois diferentes tipos de FF). No total foram realizadas seis repetições por tratamento, sendo cada parcela experimental representada por 30 ovócitos.

As combinações relativas ao FF foram: meio NCSU-37 suplementado com FFPs e FFGs. Já na avaliação dos efeitos da adição de IGF-I foram adicionadas cinco diferentes concentrações do hormônio ao meio de MIV (0, 60, 120, 180 e 240 ng/mL).

2.11. Análise estatística

Os dados são apresentados como média \pm desvio-padrão. Todas as variáveis obtidas foram modeladas de acordo com o modelo binomial de variáveis [29,43]. Foi realizado teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) e os dados analisados por ANOVA. Quando significativos a ANOVA, a taxa de maturação e os dados da FIV nos diferentes níveis de IGF-I para cada tipo de FF foram submetidos à análise de regressão e os valores obtidos para cada tipo de FF em cada um dos níveis de IGF-I foram comparados pelo teste F. Para as variáveis que não apresentaram normalidade (taxa de formação de pró-núcleo masculino, número de espermatozoides penetrados por ovócito e número de espermatozoides aderidos à zona pelúcida) foi realizada a transformação por arco seno para a obtenção de distribuição normal [28]. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$. Toda análise estatística foi realizada por meio do pacote estatístico SPSS *for* Windows versão 17.0 [44].

3. Resultados

Foi observada diferença ($P < 0,05$) na maturação dos ovócitos com FFPs e FFGs apenas no grupo controle e com a adição de 60 ng/mL de IGF-I. A taxa de maturação dos ovócitos com o uso de FFPs e FFGs não diferiu ($P > 0,05$) quando realizada a suplementação de 120, 180 e 240 ng/mL de IGF-I ao meio de MIV.

A adição de IGF-I ao meio de MIV teve efeito quadrático ($P < 0,01$) quando se utilizou FFPs. Para a maturação dos ovócitos com o uso de FFPs, a dose de 129 ng/mL de IGF-I é a que proporciona os melhores resultados. Por outro lado, a maturação ovocitária com o uso de IGF-I e FFGs teve efeito linear

decrecente ($P < 0,01$), sendo que na medida em que se aumentou a dose do hormônio, a taxa de maturação diminuiu (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 1

Efeitos da adição de fluido folicular (FF) e IGF-I exógeno no meio de maturação *in vitro* (MIV) sobre a maturação nuclear (%) (média \pm desvio-padrão) de ovócitos suínos (N = 6 repetições/30 ovócitos cada).

IGF-I (ng/mL)	Maturação nuclear		Valor de P			CV [#] (%)
	FFPs ¹	FFGs ²	FF	IGF-I	FF \times IGF-I	
0	76,3 \pm 10,7 ^b	90,0 \pm 6,9 ^a	< 0,01	< 0,01	< 0,01	3,91
60	81,8 \pm 10,2 ^b	92,0 \pm 8,1 ^a				
120 ^{NS}	89,0 \pm 6,9	86,3 \pm 7,9				
180 ^{NS}	85,3 \pm 8,1	83,0 \pm 7,7				
240 ^{NS}	83,0 \pm 7,7	80,7 \pm 10,3				

Maturação calculada a partir da % total dos ovócitos que chegaram até a metáfase II da segunda divisão meiótica.

¹FFPs, FF de FPs (2 a 5 mm de diâmetro). Regressão quadrática significativa ($P < 0,01$).

²FFGs, FF de FGs (6 a 10 mm de diâmetro). Regressão linear significativa ($P < 0,01$).

[#]CV = Coeficiente de variação.

^{a,b}Médias seguidas por diferentes letras na linha diferem pelo teste F ($P < 0,05$).

^{NS}Não significativo.

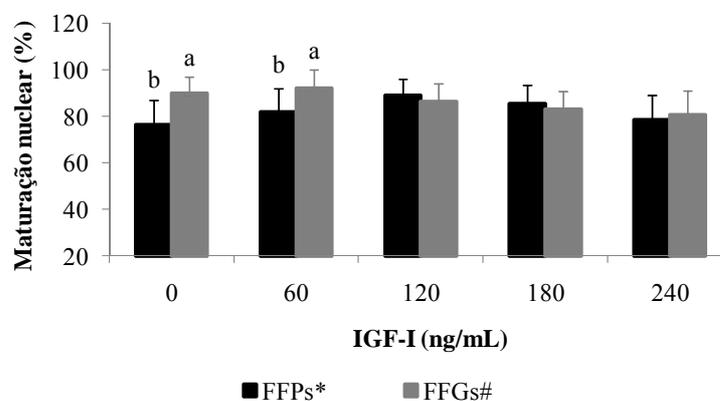


Fig. 1. Efeitos da adição de fluido folicular (FF) e IGF-I exógeno no meio de maturação *in vitro* (MIV) sobre a maturação nuclear (%) de ovócitos suínos. Valores dados como média \pm desvio-padrão (N = 6 repetições/30 ovócitos cada).

^{a,b}Letras diferentes denotam diferença significativa pelo teste F (P < 0,01).

*Regressão quadrática significativa (P < 0,01), $y = 75,928571 + 0,181548x - 0,000704x^2$; $R^2 = 91,43$. #Regressão linear significativa (P < 0,01), $y = 92,566667 - 0,047778x$; $R^2 = 88,79$.

FFPs, FF de FPs (2 a 5 mm de diâmetro) e FFGs, FF de FGs (6 a 10 mm de diâmetro).

Os resultados obtidos na fertilização (penetração, monospermia, eficiência, número de espermatozoides penetrados por ovócito e aderidos a zona pelúcida e formação de pró-núcleos) com o uso de FF e IGF-I estão demonstrados na Tabela 2. Não foi observado efeito (P > 0,05) da adição de IGF-I no meio de MIV contendo FFGs sobre os resultados da FIV. Para a penetração espermática houve efeito quadrático (P < 0,01) desse hormônio quando FFPs foi utilizado (Figura 2), sendo a dose de 179 ng/mL de IGF-I a que

proporciona maior penetração. As taxas de penetração não diferiram ($P > 0,05$) entre os ovócitos maturados com FFPs e FFGs quando utilizado 60 e 180 ng/mL de IGF-I no meio de maturação.

Quanto à monospermia, apesar dos ovócitos maturados com FFGs adicionados de 180 ng/mL de IGF-I apresentarem maiores ($P < 0,05$) taxas de monospermia em comparação com os ovócitos maturados com FFPs nessa mesma dose de hormônio, a porcentagem final da eficiência da fertilização não diferiu ($P > 0,05$) entre os ovócitos maturados com FFPs ($24,3 \pm 10,2$) e FFGs ($30,12 \pm 8,2$). Isso foi devido a uma semelhança ($P > 0,05$) na porcentagem de penetração dos ovócitos maturados nos dois tipos de FF na mesma dose de IGF-I. Apenas a adição de 120 ng/mL de IGF-I promoveu resultados semelhantes ($P > 0,05$) entre os diferentes tipos de FF. Para os demais níveis de IGF-I adicionados, a monospermia foi maior ($P < 0,05$) nos ovócitos maturados com FFGs.

Assim como para a penetração, o IGF-I apresentou efeito quadrático ($P < 0,01$) sobre a taxa de monospermia quando da maturação ovocitária com FFPs ($y = 31,0009524 + 0,147738x - 0,000605x^2$; $R^2 = 76,83$). A dose de 122 ng/mL de IGF-I, obtida pela derivação da equação, eleva as taxas de monospermia nos ovócitos maturados com a adição de FFPs.

A eficiência da fertilização não diferiu ($P > 0,05$) entre os ovócitos maturados com os dois tipos de fluidos foliculares quando adicionados de 120 e 180 ng/mL de IGF-I. Para a dose de 120 ng/mL de IGF-I esse fato ocorreu, pois, apesar da taxa de penetração ter sido maior com o uso de FFGs em relação ao FFPs ($81,0 \pm 12,4$ vs $73,7 \pm 10,5$), a taxa de monospermia não diferiu ($P > 0,05$) entre os ovócitos maturados nos dois grupos. Observou-se efeito quadrático ($P < 0,01$) do IGF-I quando utilizado FFPs ($y = 13,442857 + 0,194127x - 0,000721x^2$; $R^2 = 86,39$), sendo a melhor dose estimada em 135 ng/mL de IGF-I.

O número de espermatozoides penetrados por ovócito foi semelhante ($P > 0,05$) com o uso dos dois tipos de fluidos foliculares e diferentes doses de IGF-I (Figura 2). Observou-se apenas que a média do número de espermatozoides penetrados por ovócito quando utilizado FFPs foi maior ($P < 0,01$) que com o uso de FFGs ($2,4 \pm 0,6$ vs $2,0 \pm 0,3$, respectivamente). Não houve efeito ($P > 0,05$) da adição de FF e doses de IGF-I sobre o número de espermatozoides aderidos a zona pelúcia, sendo que com o uso de FFPs a média foi de $5,3 \pm 1,3$ e para FFGs de $5,6 \pm 1,0$. Houve diferença ($P = 0,01$) na formação de pró-núcleos apenas entre os FFPs e FFGs ($93,7 \pm 6,4$ vs $97,1 \pm 4,0$, respectivamente), sem nenhuma influência ($P > 0,05$) com relação às doses de IGF-I (Tabela 2).

Tabela 2

Efeitos da adição de fluido folicular (FF) e IGF-I no meio de maturação *in vitro* (MIV) sobre os resultados de fertilização (média \pm desvio-padrão) de ovócitos suínos (N = 6 repetições/30 ovócitos cada).

Fluido Folicular*	IGF-I (ng/mL)					CV (%)	Valor de P		
	0	60	120	180	240		FF	IGF-I	FF \times IGF-I
- Penetração (%) -									
FFPs ¹	61,3 \pm 12,1 ^b	66,8 \pm 9,4	73,7 \pm 10,5 ^b	75,7 \pm 10,4	72,2 \pm 5,4 ^b	6,99	< 0,01	< 0,01	< 0,01
FFGs	78,2 \pm 13,3 ^a	72,7 \pm 11,3	81,0 \pm 12,4 ^a	73,8 \pm 13,2	80,7 \pm 9,3 ^a				
- Monospermia (%) -									
FFPs ¹	31,3 \pm 10,5 ^b	34,7 \pm 8,7 ^b	42,8 \pm 9,0	36,0 \pm 10,2 ^b	31,3 \pm 8,9 ^b	14,73	< 0,01	0,02	0,04
FFGs	51,2 \pm 4,5 ^a	45,5 \pm 7,6 ^a	55,0 \pm 4,6	48,8 \pm 6,5 ^a	56,2 \pm 4,4 ^a				
- Eficiência da fertilização (%) -									
FFPs ¹	14,2 \pm 3,9 ^b	19,3 \pm 6,5 ^b	28,5 \pm 8,8	24,3 \pm 10,2	18,2 \pm 7,0 ^b	20,79	< 0,01	0,02	0,01
FFGs	36,5 \pm 8,4 ^a	37,5 \pm 13,1 ^a	38,5 \pm 8,3	30,12 \pm 8,2	37,0 \pm 8,0 ^a				
- Número de espermatozoides penetrados por ovócito -									
FFPs	3,3 \pm 2,1	2,8 \pm 1,7	3,1 \pm 2,2	2,6 \pm 1,6	2,8 \pm 1,7	17,98	< 0,01	0,10	0,12
FFGs	2,5 \pm 1,9	2,8 \pm 2,0	2,4 \pm 1,7	2,5 \pm 1,7	2,2 \pm 1,6				
- Número de espermatozoides aderidos à zona pelúcida -									
FFPs	4,4 \pm 2,7	5,6 \pm 2,7	6,8 \pm 3,9	5,2 \pm 2,3	7,1 \pm 2,6	12,47	0,09	0,13	0,11
FFGs	6,5 \pm 4,2	7,2 \pm 3,1	5,4 \pm 2,7	6,3 \pm 3,3	5,4 \pm 2,6				
- Formação de pró-núcleo masculino (%) -									
FFPs	92,7 \pm 7,8	89,5 \pm 7,9	95,2 \pm 5,2	96,3 \pm 4,8	96,2 \pm 3,1	5,18	0,01	0,16	0,23
FFGs	97,8 \pm 2,4	97,3 \pm 4,3	94,0 \pm 4,1	100,0 \pm 0,0	97,5 \pm 4,0				

¹Regressão quadrática significativa (P < 0,01).

^{a,b}Médias seguidas por diferentes letras na coluna diferem pelo teste F (P < 0,05).

*FFPs, FF de FPs (2 a 5 mm de diâmetro) e FFGs, FF de FGs (6 a 10 mm de diâmetro).

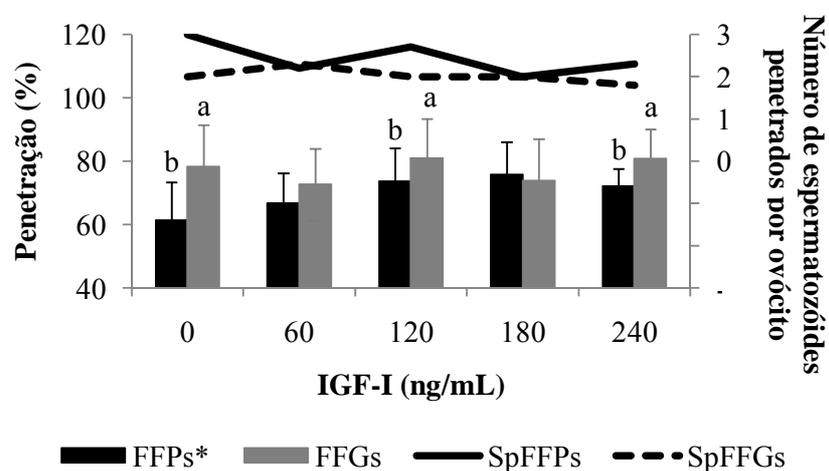


Fig. 2. Efeitos da adição de fluido folicular (FF) e IGF-I exógeno no meio de maturação *in vitro* (MIV) sobre a penetração (%) e número de espermatozoides penetrados por ovócito. Valores de penetração dados como média \pm desvio-padrão (N = 6 repetições/30 ovócitos cada).

^{a,b}Letras diferentes denotam diferença significativa pelo teste F (P < 0,01).

*Regressão quadrática significativa (P < 0,01), $y = 61,104762 + 0,153730x - 0,00043x^2$; $R^2 = 96,42$.

FFPs, FF de FPs (2 a 5 mm de diâmetro); FFGs, FF de FGs (6 a 10 mm de diâmetro); SpFFPs, número de espermatozoides penetrados por ovócito com o uso de FFPs no meio de MIV e SpFFGs, número de espermatozoides penetrados por ovócito com o uso de FFGs no meio de MIV.

4. Discussão

O presente estudo demonstrou que a adição de IGF-I ao meio de MIV com o uso de FFGs não afeta a taxa de maturação final (metáfase II após 44 horas de maturação) e os resultados da fertilização em suínos. Por outro lado, a adição de IGF-I ao meio de MIV com o uso de FFPs apresenta efeito benéfico na maturação e nas taxas de fertilização quando utilizado a uma concentração entre 129 a 179 ng/mL. Portanto, a presença do IGF-I no meio de MIV potencializa os efeitos do FFPs sobre a taxa de maturação, penetração, monospermia e eficiência da fertilização. Assim, devido aos FPs estarem presentes em maior número nos ovários de fêmeas pré-púberes [14,15], o FF obtido a partir de estes pode ser uma importante alternativa no avanço da PIV de embriões em suínos.

Nesse trabalho, assim como documentado por outros autores, a maturação e os resultados da fertilização sem a adição de IGF-I foram maiores quando utilizado FFGs na MIV em comparação com o FFPs. Algriany et al. [7] obtiveram taxas de maturação de aproximadamente 65% e 74%, com o uso de FFPs e FFGs, respectivamente. Por outro lado, Ito et al. [8] observaram índices de monospermia de 45% com o uso de FFGs e 21,7% com o uso de FFPs no meio de MIV. Esses achados, assim como descrito por Algriany et al. [7] e Qian et al. [45], apóiam a hipótese de que fatores foliculares derivados das células da granulosa ou das células da teca e acumulados no FF nos estágios finais do desenvolvimento folicular dão suporte a capacidade de desenvolvimento dos ovócitos.

Para a MIV de ovócitos suínos, geralmente se utiliza ovócitos imaturos obtidos a partir de folículos de diâmetro entre 3 – 8 mm [1,46], sendo que esses apresentam uma maior capacidade de maturação, fertilização e clivagem em comparação com ovócitos coletados de folículos de menor diâmetro [1,7,8].

Portanto, isso sugere que, com o aumento no tamanho folicular, importantes mudanças ocorrem nas células do *cumulus* e nos fatores presentes no FF responsáveis por uma adequada maturação ovocitária. Ito et al. [8] descrevem que a progressão da maturação nuclear está intimamente relacionada com uma elevada capacidade de desenvolvimento dos ovócitos e que existem fatores no FFGs que aceleram a maturação nuclear. A partir dos resultados desse estudo, pode-se afirmar que um dos fatores responsáveis por promover a maturação nuclear é o IGF-I, pois sua adição no meio de MIV com FFPs promoveu melhora na taxa de maturação e nos resultados de fertilização.

No presente estudo, independentemente da fonte de FF e dos níveis de IGF-I exógeno adicionados, as taxas de maturação obtidas apresentaram-se dentro dos valores indicados por Kikuchi et al. [47] Zhang et al. [48] que descreveram que durante a MIV, aproximadamente 10 a 30% dos ovócitos não atingem a metáfase II da segunda divisão meiótica.

No FFGs foi relatado nível de IGF-I livre superior ao presente em FFPs (67 vs 171, respectivamente) (Oberlender et al., dados não publicados). Esse fato pode explicar a ausência de efeito das diferentes concentrações de IGF-I na taxa de maturação e nos resultados de FIV dos ovócitos quando utilizado FFGs. A diminuição na taxa de maturação com a adição do hormônio pode ter sido ocasionada pelo fenômeno de “*down-regulation*” dos receptores de IGF-I [49] presentes na superfície das células da granulosa do ovócito. Isso ocorre devido a uma dessensibilização dos receptores pela presença excessiva de hormônio. Assim, uma internalização ou até mesmo uma falta de responsividade dos receptores pode ocorrer na presença de altas quantidades do hormônio [50]. Em adição, nesse estudo, as doses de IGF-I utilizadas variaram de 50 a 200% a mais que as concentrações fisiológicas presentes em FFPs e FFGs.

Pinto et al. [51] demonstraram que excessivas quantidades de IGF-I diminuem a viabilidade de embriões humanos e levam ao “*down-regulation*” dos

receptores de IGF-I [52]. Além disso, as células da granulosa sintetizam IGF-I [17], expressam seu receptor [53] e várias proteínas de ligação ao IGF-I (IGFBPs) que são responsáveis por regular a atividade desse hormônio, enquanto o FF contém IGF-I e possui também uma rica fonte de IGFBPs [54]. Assim, a presença de IGFBPs no FFGs pode ter mascarado algum possível efeito do IGF-I exógeno. Outra hipótese é que o IGF-I adicionado não exerceu nenhum efeito porque as IGFBPs não estavam disponíveis no FFGs [2]. Portanto, o FFGs apresenta níveis fisiológicos de IGF-I adequados para fornecer uma correta maturação ovocitária e posterior fertilização, sendo que a adição de IGF-I exógeno ao meio de MIV quando utilizado FFGs compromete o desenvolvimento ovocitário e as taxas de fertilização.

A adição de IGF-I ao meio de maturação de ovócitos e seus efeitos no desenvolvimento embrionário em suínos têm sido avaliados em algumas pesquisas [2,6,20–23]. Porém, nenhum estudo foi encontrado no qual a adição de IGF-I ao meio de MIV com o uso de FF obtido de folículos de diferentes diâmetros e seus efeitos na maturação e fertilização foram avaliados.

Gruppen et al. [2] demonstraram que a adição de 10 e 100 ng/mL de IGF-I ao meio de MIV não apresentou efeitos benéficos nas taxas de maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário em suínos. Resultados semelhantes foram demonstrados por Reed et al. [20] e Illera et al. [21] avaliando a adição do IGF-I no meio de MIV e seus efeitos na maturação e fertilização e, por Cui et al. [22] avaliando os efeitos do IGF-I no desenvolvimento de embriões partenogênicos. Entretanto, Xia et al. [6] observaram que a adição de 50 ng/mL de IGF-I no meio de MIV proporcionou melhor taxa de clivagem embrionária, e a adição de 200 ng/mL do hormônio no meio de MIV proporcionou também maior número de embriões desenvolvidos até o estágio de oito células. Kim et al. [23] também obtiveram maior número de embriões em estágio de duas células, número de blastocistos formados e clivados quando

utilizaram 50 ng/mL de IGF-I. No presente estudo, a ausência de efeito do IGF-I no meio de MIV sobre a maturação e os resultados de fertilização, assim como demonstrado em outros estudos [2,20,21], apenas pode ser aplicado quando da adição de hormônio associado ao uso de FFGs, sendo que o uso de IGF-I e FFPs na MIV melhora os resultados de maturação e fertilização.

A maturação ovocitária pode ser regulada por fatores produzidos pelas células foliculares [9]. Corrobora com essa hipótese o fato de que fatores de crescimento, dentre eles o IGF-I, são produzidos por células ovarianas e se acumulam no FF [55]. Além disso, conforme os resultados obtidos no presente estudo é possível afirmar que o IGF-I é um fator de extrema importância para o desenvolvimento ovocitário até a sua completa maturação e posterior fertilização.

A maioria das pesquisas envolvendo a PIV de embriões suínos utiliza fêmeas pré-púberes como doadoras de ovócitos [56]. Além disso, os métodos atuais dependem de uma fonte de oócitos competentes e capazes de se desenvolver a partir de grandes folículos antrais ou pré-ovulatórios [18]. Porém, em suínos, fêmeas pré-púberes apresentam ovários com um número pequeno de folículos grandes [14,15]. Portanto, sistemas de PIV de embriões suínos devem ser desenvolvidos principalmente com o uso de ovócitos e FF obtido a partir do grande número de folículos pequenos presentes no ovário. De acordo com Coy e Romar [1], Funahashi e Day [57] e Gil et al. [58] um meio de maturação ideal deve ser produzido a fim de promover elevadas taxas de monospermia, formação de pró-núcleo e embriões suínos.

No presente estudo, com base nos efeitos quadráticos obtidos para o uso de IGF-I no meio de MIV com FFPs, as doses de IGF-I que melhor exerceriam efeitos sobre a taxa de maturação, penetração, monospermia e eficiência da fecundação são 129, 179, 122 e 135 ng/mL, respectivamente. Portanto, fundamentado nesses achados, pode-se sugerir que quando houver utilização de

FFPs na maturação de ovócitos suínos, o uso de uma concentração de IGF-I entre 129 e 179 ng/mL no meio de MIV promove resultados semelhantes aos obtidos com o uso de FFGs sobre a maturação ovocitária e as taxas de fertilização. No entanto, apesar desses efeitos positivos, o uso do IGF-I no meio de MIV com FFPs não impediu a ocorrência da polispermia, cuja incidência no presente estudo foi semelhante ao relatado por outros autores [1,8,21] e também não melhorou a eficiência da FIV [59].

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que a adição de IGF-I no meio de MIV com o uso de FFPs aumenta a taxa de maturação ovocitária e melhora os resultados de fertilização, sendo esses semelhantes com o uso de FFGs sem a adição de IGF-I no meio de MIV. O IGF-I não apresenta nenhum efeito na taxa de maturação e resultados de fertilização quando adicionado no meio de MIV com o uso de FFGs. Esses achados fornecem evidência de que o IGF-I desempenha importante função na MIV e FIV de ovócitos suínos quando da utilização de FFPs.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Eduardo Alves (DFP/UFLA) pela disponibilização do microscópio de epifluorescência utilizado na avaliação dos resultados de MIV e FIV, ao Prof. Dr. Ruben Delly Veiga (DEX/UFLA) pelo auxílio na realização da análise estatística e interpretação dos dados e também a equipe do “Matadouro/Frigorífico NUTRILI” por terem fornecido todo material biológico utilizado nesse trabalho. O estudo também foi apoiado financeiramente pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (PNPD Institucional e Pró-equipamentos 2010), FAPEMIG (SHA-APQ-02548-10), Departamentos de Medicina Veterinária e Zootecnia e Programas de Pós-graduação em Zootecnia e Ciências Veterinárias da UFLA.

Referências

- [1] Coy P, Romar R. *In vitro* production of pig embryos: a point of view. *Reprod Fertil Dev* 2002;14:275-86.
- [2] Grupen CG, Nagashima H, Nottle MB. Role of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on porcine oocyte maturation and embryonic development *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 1997;9:571-5.
- [3] Gajda B. Factors and methods of pig oocyte and embryo quality improvement and their application in reproductive biotechnology. *Reprod Biol* 2009;9:97-112.
- [4] Nagashima H, Grupen CG, Ashman RJ, Nottle MB. Developmental competence of *in vivo* and *in vitro* matured porcine oocytes after subzonal sperm injection. *Mol Reprod Dev* 1996;45:359-63.
- [5] Nagai T. Current status and perspectives in IVM-IVF of porcine oocytes. *Theriogenology* 1994;41:73-8.
- [6] Xia P, Tekpetey FR, Armstrong DT. Effect of IGF-I on pig oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development *in vitro*, and on granulosa and *cumulus* cell biosynthetic activity. *Mol Reprod Dev* 1994;38:373-9.
- [7] Algriany O, Bevers M, Schoevers E, Colenbrander B, Dieleman S. Follicle size-dependent effects of sow follicular fluid on *in vitro cumulus* expansion, nuclear maturation and blastocyst formation of sow *cumulus* oocytes complexes. *Theriogenology* 2004;62:1483-97.
- [8] Ito M, Iwata H, Kitagawa M, Kon Y, Kuwayama T, Monji Y. Effect of follicular fluid collected from various diameter follicles on the progression of nuclear maturation and developmental competence of pig oocytes. *Anim Reprod Sci* 2008;106:421-30.

- [9] Sirotkin AV, Dukesová J, Makarevich AV, Kubek A, Bulla J. Evidence that growth factors IGF-I, IGF-II and EGF can stimulate nuclear maturation of porcine oocytes via intracellular protein kinase A. *Reprod Nutr Dev* 2000;40:559-69.
- [10] Jeong BS, Yang X. Cysteine, glutathione, and Percoll treatments improve porcine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 2001;59:330-5.
- [11] Dode MA, Graves CN. Role of estradiol-17beta on nuclear and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Anim Reprod Sci* 2003;78:99-110.
- [12] Yoon KW, Shin TY, Park JI, Roh S, Lim JM, Lee BC, et al. Development of porcine oocytes from preovulatory follicles of different sizes after maturation in media supplemented with follicular fluids. *Reprod Fertil Dev* 2000;12:133-9.
- [13] Vatzias G, Hagen DR. Effects of porcine follicular fluid and oviduct-conditioned media on maturation and fertilization of porcine oocytes *in vitro*. *Biol Reprod* 1999;60:42-8.
- [14] Bagg MA, Vassena R, Papasso-Brambilla E, Grupen CG, Armstrong DT, Gandolfi F. Changes in ovarian, follicular, and oocyte morphology immediately after the onset of puberty are not accompanied by an increase in oocyte developmental competence in the pig. *Theriogenology* 2004;62:1003-11.
- [15] Knox RV. Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. *Domest Anim Endocrinol* 2005;29:385-97.
- [16] Monget P, Fabre S, Mulsant P, Lecerf F, Elsen JM, Mazerbourg S, et al. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol* 2002;23:139-54.
- [17] Hammond JM, Baranao JL, Skaleris D, Knight AB, Romanus JA, Rechler MM. Production of insulin-like growth factors by ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 1985;117:2553-5.

- [18] Mao J, Smith MF, Rucker EB, Wu GM, McCauley TC, Cantley TC, et al. Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis *in vitro*. *J Anim Sci* 2004;82:1967-75.
- [19] Purohit GN, Brady MS, Sharma SS. Influence of epidermal growth factor and insulin-like growth factor 1 on nuclear maturation and fertilization of buffalo *cumulus* oocyte complexes in serum free media and their subsequent development *in vitro*. *Anim Reprod Sci* 2005;87:229-39.
- [20] Reed ML, Estrada JL, Illera MJ, Petters RM. Effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor-I, and dialyzed porcine follicular fluid on porcine oocyte maturation *in vitro*. *J Exp Zool* 1993;266:74-8.
- [21] Illera MJ, Lorenzo PL, Illera JC, Petters RM. Developmental competence of immature pig oocytes under the influence of EGF, IGF-I, follicular fluid and gonadotropins during IVM-IVF processes. *Int J Dev Biol* 1998;42:1169-72.
- [22] Cui XS, Jeong YJ, Jun JH, Kim NH. Insulin-like growth factor-I alters apoptosis related genes and reduces apoptosis in porcine parthenotes developing *in vitro*. *Theriogenology* 2005;63:1070-80.
- [23] Kim S, Lee GS, Lee SH, Kim HS, Jeong YW, Kim JH, et al. Embryotropic effect of insulin-like growth factor (IGF)-I and its receptor on development of porcine preimplantation embryos produced by *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Mol Reprod Dev* 2005;72:88-97.
- [24] Neira JA, Tainturier D, Peña MA, Martal J. Effect of the association of IGF-I, IGF-II, bFGF, TGF-beta1, GM-CSF, and LIF on the development of bovine embryos produced *in vitro*. *Theriogenology* 2010;73:595-604.
- [25] Sirisathien S, Hernandez-Fonseca HJ, Brackett BG. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development *in vitro*. *Anim Reprod Sci* 2003;77:21-32.

- [26] Singhal S, Prasad S, Singh B, Prasad JK, Gupta HP. Effect of including growth factors and antioxidants in maturation medium used for *in vitro* culture of buffalo oocytes recovered *in vivo*. *Anim Reprod Sci* 2009;113:44-50.
- [27] Petters RM, Wells KD. Culture of pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl* 1993;48:61-73.
- [28] Coy P, Cánovas S, Mondéjar I, Saavedra MD, Romar R, Grullón L, et al. Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm–zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:15809-14.
- [29] Coy P, Grullón L, Cánovas S, Romar R, Matás C, Avilés M. Hardening of the zona pellucida of unfertilized eggs can reduce polyspermic fertilization in the pig and cow. *Reproduction* 2008;135:19-27.
- [30] Rath D, Long CR, Dobrinsky JR, Welch GR, Schreier LL, Johnson LA. *In vitro* production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *J Anim Sci* 1999;77:3346-52.
- [31] Asano A, Niwa K. Activation and penetration *in vitro* of pig oocytes treated with calcium ionophore. *J Reprod Dev* 2004;50:77-85.
- [32] Matás C, Martínez E, Vázquez JM, Roca J, Gadea J. *In vitro* penetration assay of boar sperm fertility: effect of various factors on the penetrability of immature pig oocytes. *Theriogenology* 1996;46:503-13.
- [33] Hong JY, Yong HY, Lee BC, Hwang WS, Lim JM, Lee ES. Effects of amino acids on maturation, fertilization and embryo development of pig follicular oocytes in two IVM media. *Theriogenology* 2004;62:1473-82.
- [34] Matás C, Coy P, Romar R, Marco M, Gadea J, Ruiz S. Effect of sperm preparation method on *in vitro* fertilization in pigs. *Reproduction* 2003;125:133-41.

- [35] Funahashi H, Day BN. Effects of the duration of exposure to supplemental hormones on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. J Reprod Fertil 1993;98:179-85.
- [36] Park CH, Lee SG, Choi DH, Lee CK. A modified swim-up method reduces polyspermy during *in vitro* fertilization of porcine oocytes. Anim Reprod Sci 2009;115:169-81.
- [37] Hancock JL, Howell GJR. The collection of boar semen. Vet Record 1959;71:664-5.
- [38] Malo C, Gil L, Gonzalez N, Martínez F, Cano R, de Blas I, et al. Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: Comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). Cryobiology 2010;61:142-7.
- [39] Pursel VG, Johnson LA. Freezing of boar spermatozoa; fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. J Anim Sci 1975;40:99-102.
- [40] Satake N, Elliott RM, Watson PF, Holt WV. Sperm selection and competition in pigs may be mediated by the differential motility activation and suppression of sperm subpopulations within the oviduct. J Exp Biol 2006;209:1560-72.
- [41] Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. Theriogenology 1995;44:859-69.
- [42] Matás C, Vieira L, García-Vázquez FA, Avilés-López K, López-Úbeda R, Carvajal JA, et al. Effects of centrifugation through three different discontinuous Percoll gradients on boar sperm function. Anim Reprod Sci 2011;127:62-72.
- [43] Coy P, Lloyd R, Romar R, Satake N, Matás C, Gadea J, et al. Effects of porcine pre-ovulatory oviductal fluid on boar sperm function. Theriogenology 2010;74:632-42.

- [44] SPSS Statistics 17.0, Rel. 17.0.1. SPSS Inc, Chicago, IL, 2008.
- [45] Qian Y, Shi WQ, Ding JT, Sha JH, Fan BQ. Predictive value of the area of expanded *cumulus* mass on development of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J Reprod Dev* 2003;49:167-74.
- [46] Ikeda K, Takahashi Y. Comparison of maturational and developmental parameters of oocytes recovered from prepubertal and adult pigs. *Reprod Fertil Dev* 2003;15:215-21.
- [47] Kikuchi K, Somfai T, Nakai M, Nagai T. Appearance, fate and utilization of abnormal porcine embryos produced by *in vitro* maturation and fertilization. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2009;66:135-47.
- [48] Zhang W, Yi K, Yan H, Zhou X. Advances on *in vitro* production and cryopreservation of porcine embryos. *Anim Reprod Sci* 2012;132:115-22.
- [49] Lee S. Insulin-like growth factor-1 induces skeletal muscle hypertrophy. *J Exerc Sci Fit* 2003;1:47-53.
- [50] Florini JR, Ewton DZ, Coolican SA. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev* 1996;17:481-517.
- [51] Pinto AB, Schlein AL, Moley KH. Preimplantation exposure to high insulin-like growth factor I concentrations results in increased resorption rates *in vivo*. *Hum Reprod* 2002;17:457-62.
- [52] Chi MM, Schlein AL, Moley KH. High insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-1 receptor. *Endocrinology* 2000;141:4784-92.
- [53] Adashi EY. Intraovarian regulation: the IGF-I example. *Reprod Fertil Dev* 1992;4:497-504.
- [54] Hammond JM, Samaras SE, Grimes R, Leighton J, Barber J, Canning SF, et al. The role of insulin-like growth factors and epidermal growth factor-related peptides in intraovarian regulation in the pig ovary. *J Reprod Fertil Suppl* 1993;48:117-25.

- [55] Demeestere I, Gervy C, Centner J, Devreker F, Englert Y, Delbaere A. Effect of insulin-like growth factor-I during preantral follicular culture on steroidogenesis, *in vitro* oocyte maturation, and embryo development in mice. *Biol Reprod* 2004;70:1664-9.
- [56] Sherrer ES, Rathbun TJ, Davis DL. Fertilization and blastocyst development in oocytes obtained from prepubertal and adult pigs. *J Anim Sci* 2004;82:102-8.
- [57] Funahashi H, Day BN. Advances in *in vitro* production of pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl* 1997;52:271-83.
- [58] Gil MA, Cuello C, Parrilla I, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA. Advances in swine *in vitro* embryo production technologies. *Reprod Domest Anim* 2010;45:40-8.
- [59] Coy P, Gadea J, Romar R, Matás C, García E. Effect of *in vitro* fertilization medium on the acrosome reaction, cortical reaction, zona pellucida hardening and *in vitro* development in pigs. *Reproduction* 2002;124:279-88.

ANEXOS

Certificado fornecido pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Lavras para a realização da pesquisa.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
NÚCLEO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
Comissão de Bioética na Utilização de Animais
 Cx.P.3037 - Lavras - MG - 37200-000 - (35) 3829-1581
cba@nintec.ufpa.br

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 009/2010**, relativo ao projeto intitulado **"BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO EM SUÍNOS: ADIÇÃO DE IGF-I AO FLUIDO FOLICULAR SUÍNO UTILIZADO PARA MADURAÇÃO E FECUNDAÇÃO IN VITRO"**, que tem como responsável **Luis David Solis Murgas**, está de acordo com os **Princípios Éticos da Experimentação Animal**, adotados pela **Comissão de Bioética na Utilização de Animais (NINTEC/PRP-Ufla)**, tendo sido aprovado na reunião de **25/05/2010**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 009/2010**, related to the project entitled **"BIOTECHNOLOGY OF SWINE REPRODUCTION: ADDITION OF THE IGF-I ON THE SWINE FOLLICULAR FLUID USED FOR MADURATION AND IN VITRO FERTILIZATION"**, under the supervision of **Luis David Solis Murgas**, is in agreement with the **Ethics Principles in Animal Experimentation**, adopted by the **Bioethic Committee in Utilization of Animals (NINTEC/PRP-Ufla)**, and was approved in **May 25, 2010**.

Lavras, 25 de maio de 2010.



Prof. Luis David Solis Murgas
 Presidente da Comissão de Bioética na Utilização de Animais

Universidade Federal de Lavras
 Pró-Reitoria de Pesquisa / NINTEC
 Campus Universitário
 Caixa Postal 3037 | CEP 37200-000 - Lavras, MG - Brasil
 Tel.: +55 (35) 3829 1581 | Fax: 3829-1127
cba@nintec.ufpa.br | www.prorektor.ufpa.br

Tabela 1A. Análise de variância e coeficiente de variação para a maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos suínos com a adição de IGF-I exógeno (0, 60, 120, 180 e 240 ng/mL) e fluido folicular (FPs, 2 a 5 mm de diâmetro e FG, 6 a 10 mm de diâmetro) no meio de MIV

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Bloco	5	3511,33	702,27	64,06	< 0,01
IGF-I	4	502,33	125,58	11,46	< 0,01
Fluido folicular (FF)	1	281,67	281,67	25,69	< 0,01
IGF-I × FF	4	680,67	170,17	15,52	< 0,01
Erro	45	493,33	10,96		
CV (%)	3,91				

Tabela 2A. Análise de variância e coeficiente de variação para a penetração espermática *in vitro* de ovócitos suínos com a adição de IGF-I exógeno (0, 60, 120, 180 e 240 ng/mL) e fluido folicular (FPs, 2 a 5 mm de diâmetro e FG, 6 a 10 mm de diâmetro) no meio de MIV

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Bloco	5	4799,35	959,87	35,97	< 0,01
IGF-I	4	610,10	152,53	5,72	< 0,01
Fluido folicular (FF)	1	814,02	814,02	30,51	< 0,01
IGF-I × FF	4	514,57	128,64	4,82	< 0,01
Erro	45	1200,82	26,68		
CV (%)	6,99				

Tabela 3A. Análise de variância e coeficiente de variação para a monospermia *in vitro* de ovócitos suínos com a adição de IGF-I exógeno (0, 60, 120, 180 e 240 ng/mL) e fluido folicular (FPs, 2 a 5 mm de diâmetro e FG, 6 a 10 mm de diâmetro) no meio de MIV

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Bloco	5	1229,48	245,90	5,96	< 0,01
IGF-I	4	539,77	134,94	3,27	0,02
Fluido folicular (FF)	1	3792,15	3792,15	91,93	< 0,01
IGF-I × FF	4	434,43	108,61	2,63	0,04
Erro	45	1856,35	41,25		
CV (%)	14,73				

Tabela 4A. Análise de variância e coeficiente de variação para a eficiência da fertilização *in vitro* de ovócitos suínos com a adição de IGF-I exógeno (0, 60, 120, 180 e 240 ng/mL) e fluido folicular (FPs, 2 a 5 mm de diâmetro e FG, 6 a 10 mm de diâmetro) no meio de MIV

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Bloco	5	1989,00	397,80	11,17	< 0,01
IGF-I	4	468,93	117,23	3,29	0,02
Fluido folicular (FF)	1	3405,07	3405,07	95,65	< 0,01
IGF-I × FF	4	545,60	136,40	3,83	0,01
Erro	45	1602,00	35,60		
CV (%)	20,79				

Tabela 5A. Análise de variância e coeficiente de variação para o número de espermatozoides penetrados por ovócito na fertilização *in vitro* (FIV) de ovócitos suínos com a adição de IGF-I exógeno (0, 60, 120, 180 e 240 ng/mL) e fluido folicular (FPs, 2 a 5 mm de diâmetro e FG, 6 a 10 mm de diâmetro) no meio de MIV

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Bloco	5	0,95	0,19	0,84	0,01
IGF-I	4	1,90	0,48	2,09	0,10
Fluido folicular (FF)	1	2,82	2,82	12,41	< 0,01
IGF-I × FF	4	1,77	0,44	1,95	0,12
Erro	45	10,22	0,23		
CV (%)	17,98				

Tabela 6A. Análise de variância e coeficiente de variação para o número de espermatozoides aderidos à zona pelúcida na fertilização *in vitro* (FIV) de ovócitos suínos com a adição de IGF-I exógeno (0, 60, 120, 180 e 240 ng/mL) e fluido folicular (FPs, 2 a 5 mm de diâmetro e FG, 6 a 10 mm de diâmetro) no meio de MIV

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Bloco	5	0,53	0,11	0,19	0,02
IGF-I	4	7,43	1,86	3,28	0,13
Fluido folicular (FF)	1	1,67	1,67	2,95	0,09
IGF-I × FF	4	34,83	8,71	15,39	0,11
Erro	45	25,47	0,57		
CV (%)	12,47				

Tabela 7A. Análise de variância e coeficiente de variação para a taxa de formação de pró-núcleos masculinos de ovócitos suínos com a adição de IGF-I exógeno (0, 60, 120, 180 e 240 ng/mL) e fluido folicular (FPs, 2 a 5 mm de diâmetro e FG, 6 a 10 mm de diâmetro) no meio de MIV

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Bloco	5	93,35	18,67	0,76	< 0,01
IGF-I	4	168,23	42,06	1,71	0,16
Fluido folicular (FF)	1	170,02	170,02	6,93	0,01
IGF-I × FF	4	143,90	35,98	1,47	0,23
Erro	45	1104,15	24,54		
CV (%)	5,18				

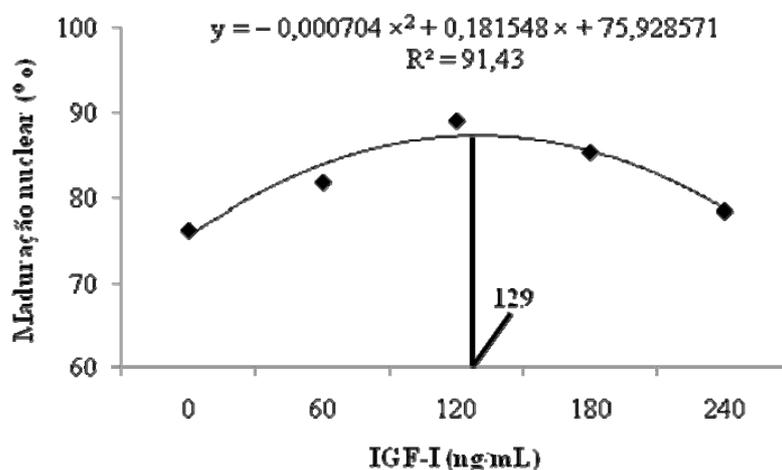


Figura 1A. Efeito da adição de fluido folicular (FF) de folículos pequenos (FG, 2 a 5 mm de diâmetro) e IGF-I exógeno (0, 60, 120, 180 e 240 ng/mL) no meio de maturação *in vitro* (MIV) sobre a maturação nuclear (%) de ovócitos suínos (N = 6 repetições/30 ovócitos cada)

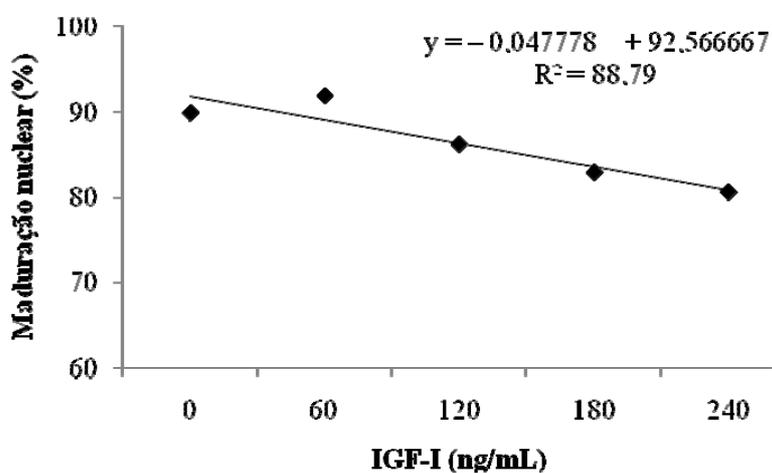


Figura 2A. Efeito da adição de fluido folicular (FF) de folículos grandes (FG, 6 a 10 mm de diâmetro) e IGF-I exógeno (0, 60, 120, 180 e 240 ng/mL) no meio de maturação *in vitro* (MIV) sobre a maturação nuclear (%) de ovócitos suínos (N = 6 repetições/30 ovócitos cada)

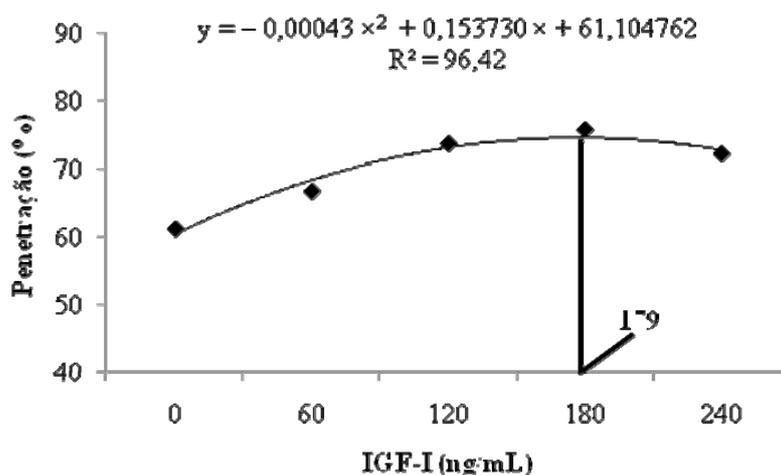


Figura 3A. Efeito da adição de fluido folicular (FF) de folículos pequenos (FG, 2 a 5 mm de diâmetro) e IGF-I exógeno (0, 60, 120, 180 e 240 ng/mL) no meio de maturação *in vitro* (MIV) sobre a penetração espermática (%) de ovócitos suínos (N = 6 repetições/30 ovócitos cada)

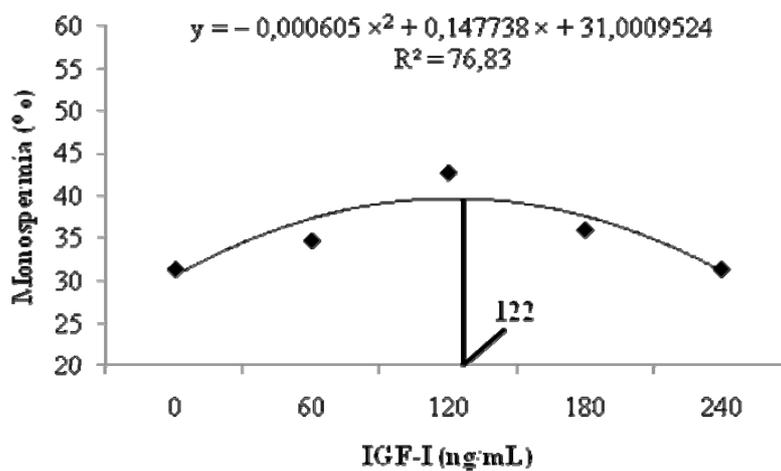


Figura 4A. Efeito da adição de fluido folicular (FF) de folículos pequenos (FG, 2 a 5 mm de diâmetro) e IGF-I exógeno (0, 60, 120, 180 e 240 ng/mL) no meio de maturação *in vitro* (MIV) sobre a monospermia (%) de ovócitos suínos (N = 6 repetições/30 ovócitos cada)

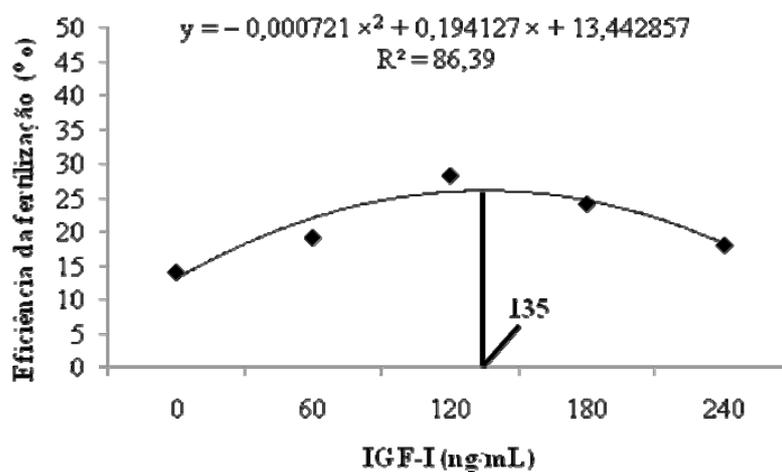


Figura 5A. Efeito da adição de fluido folicular (FF) de folículos pequenos (FG, 2 a 5 mm de diâmetro) e IGF-I exógeno (0, 60, 120, 180 e 240 ng/mL) no meio de maturação *in vitro* (MIV) sobre a eficiência da fertilização (%) de ovócitos suínos (N = 6 repetições/30 ovócitos cada)