

EFEITO DO MIO-INOSITOL NA PRODUÇÃO *in vitro* DE EMBRIÕES OVINOS

Erika Karoline de Oliveira Aureliano¹
Andreza Mayara Carneiro Lima¹
Damaris Raquel Pires Santos¹
Beatriz Cavalcanti de Freitas¹
Jossimara de Melo Silva¹
Luana Kealy Pimentel de Oliveira²
Sueli de Oliveira Lima³
Ailton Batista Pereira¹
Isabela Maria Lopes¹
Bruna Moura Silva⁴
Mabel Freitas Cordeiro⁵
Edilson Soares Lopes Júnior⁴

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da inclusão de mio-inositol no meio de maturação *in vitro* de oócitos sobre a PIV de embriões ovinos. A colheita de oócitos foi realizada a partir de ovários obtidos em abatedouro, os quais foram aspirados e levados à maturação *in vitro*, sendo divididos em quatro grupos: no grupo CON, os complexos cumulus oócitos (CCO) foram imersos em TCM-199, suplementado com 500 UI/mL de penicilina, 0,5 mg de estreptomicina, 1,25 µg de anfotericina, 0,2 mM de piruvato de sódio, 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), 10 ng/mL de fator de crescimento epidérmico (EGF), 10 µg/mL de FSH e LH e µg/ml 17β-estradiol; nos grupos MIO20, MIO30 e MIO40, os oócitos foram maturados no meio do grupo CON, suplementado com 20, 30 e 40 mM de mio-inositol. Após isso, os oócitos foram avaliados quanto a presença ou ausência da expansão de células do cumulus e quanto ao grau de expansão e destinados à fecundação *in vitro*, em meio FIV, juntamente com espermatozoides. Após a FIV, foram avaliados os presumíveis zigotos que seguiram para o cultivo *in vitro*. Foram avaliadas clivagens no dia 1 e dia 2, sendo dia 0 o dia do início do cultivo *in vitro*. Os dados foram apresentados em porcentagem e foi utilizado o teste do Qui-quadrado no software Epi Info. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$. Foi notório que não houve diferença significativa em relação aos oócitos com expansão ou sem expansão das células do cumulus nos grupos MIO20, MIO30 e MIO40. Em relação ao grau de expansão das células do cumulus, número de presumíveis zigotos e ao número de estruturas clivadas, o mio-inositol não mostrou diferença significativa em relação ao grupo CON. Com base nessas informações, conclui-se que o mio-inositol mostrou eficaz ação antioxidante, atuando de maneira relevante na maturação oocitária. Contudo, são necessários mais estudos para esclarecer os efeitos do mio-inositol na FIV ovina.

Palavras-chave: Antioxidante, Embrião, FIV, MIV, Ovelha, PIV.

¹ Mestrando na Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF. Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco. erikakarolline.ek@gmail.com.

² Doutorando na Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF. Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco. luanakealy1@gmail.com.

³ Mestrando na Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF. Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco. Correspondência: sueli.lima@discente.univasf.edu.br.

⁴ Graduando na Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF. Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco. bruna.mouras@discente.univasf.edu.br.

⁵ Docente da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF. Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco. mabel.cordeiro@univasf.edu.br.

EFFECT OF MYO-INOSITOL ON *in vitro* PRODUCTION OF OVINE EMBRYOS**ABSTRACT**

The objective of this work was to evaluate the effect of the inclusion of myo-inositol in the *in vitro* oocyte maturation medium on the IVP of ovine embryos. The oocytes were collected from ovaries obtained in a slaughterhouse, which were aspirated and taken to *in vitro* maturation, being divided into four groups: in the CON group, the cumulus oocyte complexes (CCO) were immersed in TCM-199, supplemented with 500 IU/mL penicillin, 0.5 mg streptomycin, 1.25 µg amphotericin, 0.2 mM sodium pyruvate, 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 10 ng/mL of epidermal growth factor (EGF), 10 µg/mL of FSH and LH and µg/ml 17β-estradiol; in the MIO20, MIO30 and MIO40 groups, the oocytes were matured in the medium of the CON group, supplemented with 20, 30 and 40 mM myo-inositol. After that, the oocytes were evaluated for the presence or absence of cumulus cell expansion and for the degree of expansion and destined for *in vitro* fertilization, in IVF medium, together with spermatozoa. After IVF, the presumptive zygotes that went on to *in vitro* culture were evaluated. Cleavages were evaluated on day 1 and day 2, with day 0 being the day of *in vitro* cultivation initiation. Data were presented in percentages and the Chi-square test was used in the Epi Info software. Results were considered significant when $P < 0.05$. It was clear that there was no significant difference in relation to oocytes with or without expansion of cumulus cells in the MIO20, MIO30 and MIO40 groups. Regarding the degree of expansion of cumulus cells, number of presumed zygotes and number of cleaved structures, myo-inositol showed no significant difference in relation to the CON group. Based on this information, it is concluded that myo-inositol showed effective antioxidant action, acting in a relevant way in oocyte maturation. However, further studies are needed to clarify the effects of myo-inositol on ovine IVF.

Keywords: Antioxidant, Embryo, IVF, IVM, IVP, Sheep.

EFEECTO DEL MYO-INOSITOL EN LA PRODUCCIÓN *in vitro* DE EMBRIONES OVINOS**RESUMEN**

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inclusión de mioinositol en el medio de maduración de ovocitos *in vitro* sobre la IVP de embriones ovinos. Los ovocitos fueron colectados de ovarios obtenidos en matadero, los cuales fueron aspirados y llevados a maduración *in vitro*, siendo divididos en cuatro grupos: en el grupo CON, los complejos de ovocito cumulus (CCO) fueron sumergidos en TCM-199, suplementado con 500 UI /mL de penicilina, 0,5 mg de estreptomomicina, 1,25 µg de anfotericina, 0,2 mM de piruvato de sodio, 10 % (v/v) de suero fetal bovino (FBS), 10 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (EGF), 10 µg/mL de FSH y LH y µg/ml 17β-estradiol; en los grupos MIO20, MIO30 y MIO40, los ovocitos se maduraron en el medio del grupo CON, suplementado con mioinositol 20, 30 y 40 mM. Posteriormente, los ovocitos fueron evaluados por la presencia o ausencia de expansión celular del cúmulo y por el grado de expansión y destinados a fecundación *in vitro*, en medio FIV, junto con los espermatozoides. Después de la FIV, se evaluaron los presuntos cigotos que pasaron a cultivo *in vitro*. Las divisiones se evaluaron el día 1 y el día 2, siendo el día 0 el día de inicio del cultivo *in vitro*. Los datos se presentaron en porcentajes y se utilizó la prueba de Chi-cuadrado en el software Epi Info. Los resultados se consideraron significativos cuando $P < 0,05$. Estaba claro que no hubo diferencia significativa en relación con los ovocitos con o sin expansión de las células del cúmulo en los grupos MIO20, MIO30 y MIO40. En cuanto al grado

de expansión de las células del cúmulo, número de presuntos cigotos y número de estructuras escindidas, el mioinositol no mostró diferencia significativa en relación al grupo CON. Con base en esta información, se concluye que el mioinositol mostró una acción antioxidante efectiva, actuando de manera relevante en la maduración de los ovocitos. Sin embargo, se necesitan más estudios para aclarar los efectos del mioinositol en la FIV ovina.

Palabras-clave: Antioxidante, Embrión, FIV, MIV, Oveja, PIV.

INTRODUÇÃO

Apesar de ser uma boa alternativa para aumentar o potencial produtivo dos animais, a produção *in vitro* (PIV) de embriões em ovinos ainda apresenta baixas taxas de sucesso em ovinos. Um dos aspectos que influencia a PIV ovina são os componentes presentes no meio de maturação *in vitro* (MIV). Essa etapa é considerada a mais complexa, pois é nela que deve ocorrer a primeira retomada da meiose tendo como resultado final, um oócito apto a ser fecundado. Dessa forma, o resultado da MIV depende tanto da qualidade intrínseca dos oócitos imaturos, quanto das condições *in vitro* da maturação, que podem modular a competência final do oócito após a MIV (1).

Antioxidantes estão sendo utilizados nos meios de MIV com a função de controlar a alta produção das espécies reativas de oxigênio (ERO) que podem causar estresse oxidativo, reduzindo a qualidade do oócito. Diversos antioxidantes já são utilizados atualmente nos meios de maturação, como, por exemplo, a quercetina (2), dentre outros.

Um exemplo de antioxidante que vem sendo utilizado, atualmente, é o mio-inositol (MI), definido como um esteroisômero do inositol, sendo a forma mais abundante encontrada no sistema nervoso central (SNC). O MI atua na manutenção da osmolaridade celular por apresentar ação antioxidante e ser considerado um regulador osmótico (3). O MI tem provocado a redução o estresse oxidativo em espécies como camundongos e bovinos, além de desempenhar um papel antioxidante (4).

Estudos mais detalhados devem ser realizados, visto que são poucos os trabalhos encontrados na espécie ovina que esclareçam os efeitos do uso de mio-inositol na maturação *in vitro* de oócitos, refletindo na PIV de embriões ovinos. Assim sendo, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da inclusão de mio-inositol no meio de maturação *in vitro* de oócitos sobre a PIV de embriões ovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos éticos

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), sob o número de protocolo N° 0006/261120.

Meios e reagentes

Os meios e reagentes utilizados na produção *in vitro* de embriões foram adquiridos na Sigma Aldrich Brasil[®].

Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal (LAFIBRA), situado no Campus Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), localizada em Petrolina, Pernambuco.

Colheita e seleção de oócitos

Para a colheita de oócitos, ovários foram obtidos do Abatedouro Frigorífico de Caprinos e Ovinos municipal de Rajada, Pernambuco, imediatamente após o abate de ovelhas Sem Padrão Racial Definido (SPRD).

Os ovários foram transportados até o laboratório, dentro de 1 hora, em solução de NaCl 0,9%, contendo 0,05 g de pentabiótico/L, sendo pentabiótico composto por Estreptomicina básica, Dihidroestreptomicina básica, Benzilpenicilina benzantina, Benzilpenicilina procaína e Benzilpenicilina potássica. No laboratório, os ovários foram lavados, três vezes, em solução salina aquecida, retirados os tecidos adjacentes e mantidos em banho-maria, a 34°C. Para a colheita dos complexos cumulus-oócitos (CCO), foi utilizada uma bomba de vácuo a uma pressão de 5 mL/min, agulha 18G e o meio de recuperação composto por TCM199 com 25 mM de HEPES suplementado com 50 UI/mL heparina sódica, 500 UI de penicilina, 0,5 mg estreptomicina e 1,5 µg de anfotericina e 1% (v/v) de soro fetal bovino (SFB). Logo após a colheita, os CCO, dispostos no fluido folicular foram vertidos em placas de petri de 100 mm, analisados sob estereomicroscópio e classificados, sendo selecionados para a maturação *in vitro* apenas os de Graus I e II (5).

Maturação *in vitro* de oócitos (MIV) e delineamento experimental

Após a seleção e classificação oocitária, os complexos cumulus-oócitos (CCO) de melhor qualidade foram mantidos em meio TCM-HEPES até o momento da maturação, quando foram divididos em quatro grupos: no grupo CON, os CCO foram imersos em TCM-199, suplementado com 500 UI de penicilina, 0,5 mg de estreptomicina, 1,25 µg de anfotericina, 0,2 mM de piruvato de sódio, 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), 10 ng/mL de fator de crescimento epidérmico (EGF), 10 µg/mL de FSH e LH e 1 µg/mL de 17 β-estradiol; nos grupos MIO20, MIO30 e MIO40, os oócitos foram maturados no meio do grupo CON, suplementado com 20,0, 30,0 e 40,0 mM de mio-inositol, respectivamente.

Os CCO foram dispostos em placa de petri de 100 mm, em número de 10 CCO por gota de 50 µL de meio MIV, sob óleo mineral, durante 24 horas, em estufa de cultivo, a 38,5°C, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Ao final do processo de maturação, foi estimado o grau de expansão das células do cumulus, como também a presença e ausência de expansão das células do cumulus, classificando-os em: Total (Grau 1), Moderado (Grau 2) e Leve (Grau 3) (6).

Fecundação *in vitro* de oócitos (FIV)

Para fecundação *in vitro* foi utilizado sêmen fresco, foi colhido através do método de colheita por vagina artificial (7), a partir de carneiros com fertilidade comprovada. Em seguida, foi disposto em cima de um gradiente de Percoll 45%/90%. Os espermatozoides móveis foram recuperados por centrifugação, a 700G, por 15 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 2 mL de meio de FIV (SOF[®], suplementado com 500 UI de penicilina, 0,5 mg de estreptomicina, 1,25 µg de anfotericina, 10% de soro de ovelha em estro, 10 µg/mL de hipotaurina e 10 mg/mL de heparina sódica) e lavado por centrifugação (100G; 5 minutos). O novo precipitado foi ressuspenso em 2 mL de meio FIV. Após aferição da concentração espermática total, a concentração final foi ajustada para 1 x 10⁶ espermatozoides/mL, no volume total de 50 µL/gota

de meio FIV, em placa de petri, sob óleo mineral. Os oócitos maduros, também em número de 10 unidades, juntamente com os espermatozoides selecionados, foram inclusos em gotas de 50 µL de meio de fecundação *in vitro* (FIV). A FIV foi realizada por um período de 18 a 20 horas, em estufa de cultivo, a 38,5°C, contendo 5% de CO₂. Os presumíveis zigotos foram avaliados quanto à presença do 2º corpúsculo polar no espaço perivitelínico, utilizando, um microscópio invertido (BEL INV-100®; BEL, São Paulo, Brasil).

Cultivo *in vitro* de embriões (CIV)

Os presumíveis zigotos foram desnudados e submetidos ao cultivo *in vitro* por 48 h em meio contendo 50 µL de fluido sintético de oviduto (SOF), suplementado com 3 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), sob óleo mineral, em placas de petri, contendo de 10 a 15 estruturas por gota. As placas foram cultivadas em estufa de cultivo a 38,5°C com 5% de CO₂. O número de estruturas clivadas foi registrado no fim do período de cultivo.

Análise estatística

Os dados foram apresentados em porcentagem e as variáveis de graus de expansão das células do cumulus e número de estruturas clivadas foram comparadas usando o teste do Qui-quadrado no software Epi Info (Epi Info 7.2.5, Atlanta, GA, EUA, 2021). Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi avaliada a ação do mio-inositol em meio MIV, sendo utilizadas diferentes concentrações (MIO20, MIO30, MIO40), a fim de conseguir a concentração com melhor taxa de expansão das células do cumulus.

Quanto aos graus de expansão das células dos cumulus (Tabela 1), não houve diferença significativa ($P > 0,05$), embora os CCO maturados na presença de 20,0 (MIO20) e 30,0 mM (MIO30) de mio-inositol tendessem a expandir mais que aqueles maturados no grupo CON.

Considerando a comparação entre grupos de tratamento, dentro de cada grau de expansão, os CCO maturados na presença de 30,0 mM (MIO30) de mio-inositol tenderam ($P > 0,05$) a expandir de forma total mais que aqueles maturados no grupo CON (Tabela 1). Já com relação aos graus de expansão moderado e leve, não foi possível observar diferença significativa entre os grupos de tratamentos testados (Tabela 1).

Analisando a comparação entre graus de expansão e dentro de cada grupo de tratamento testado, foi possível observar que não houve diferença significativa ($P > 0,05$). Embora sem diferença significativa ($P > 0,05$), os CCO maturados na presença de 20,0 (MIO20) e 30,0 mM (MIO30) de mio-inositol tenderam a expandir mais que aqueles maturados no grupo CON. Este achado pode ser explicado pelo fato do mio-inositol atuar na manutenção da osmolaridade celular, por apresentar ação antioxidante e por ser considerado um regulador osmótico (3). Foi observado também que, por conta de sua ação antioxidante, a suplementação com mio-inositol provoca uma diminuição do estresse oxidativo, podendo melhorar o potencial de fertilização (4), melhorando e aumentando, dessa forma, a qualidade de maturação e desenvolvimento desses oócitos.

Ao nível de maturação oocitária, a ação efetiva do MI depende de outros fatores diferentes, como em relação à qualidade do fluido folicular presente no folículo, o que determina diretamente as concentrações e equilíbrio dos hormônios, como também o tamanho e o volume do folículo. Foi relatado que a ação de níveis mais altos de MI pode incrementar a qualidade de folículos ovarianos e oócitos (8).

Com relação à fecundação *in vitro*, observando o número de presumíveis zigotos (Tabela 2) oriundos dos grupos de tratamento CON, MIO20, MIO30 e MIO40, não foi possível observar diferença significativa ($P > 0,05$). Contudo, observando o número de estruturas clivadas, foi verificado que os grupos tratados com MI foram significativamente superiores ao grupo CON ($P < 0,05$).

Tabela 1. Graus de expansão de células do cumulus (%) de oócitos ovinos maturados *in vitro* na ausência (CON) ou na presença de 20 mM (MIO20), 30 mM (MIO30) e 40 mM (MIO40) de mio-inositol.

Grupos	Nº de CCO I e II	Taxa de expansão % (n)	Grau de expansão % (n)		
			Total	Moderado	Leve
CON	27	88,8(24/27) ^A	25,0(6/24) ^{Aa}	41,6(10/24) ^{Aa}	38,3(8/24) ^{Aa}
MIO 20	36	94,4(34/36) ^A	17,6(6/34) ^{Ba}	44,1(15/34) ^{Aa}	38,2(13/34) ^{Aa}
MIO 30	36	91,6(33/36) ^A	33,3(11/33) ^{Aa}	36,3(12/33) ^{Aa}	30,3(10/33) ^{Aa}
MIO 40	36	86,1(31/36) ^A	19,3(6/31) ^{Aa}	38,7(12/31) ^{Aa}	41,9(13/31) ^{Aa}

^{A, B} Letras maiúsculas indicam diferenças na mesma coluna ($P < 0,05$). ^{a, b} Letras minúsculas indicam diferenças na mesma linha ($P < 0,05$).

Tabela 2. Número de presumíveis zigotos e estruturas clivadas após a fecundação *in vitro* de oócitos ovinos maturados na ausência (CON) ou na presença de 20 mM (MIO20), 30 mM (MIO30) e 40 mM (MIO40) de mio-inositol.

Tratamentos	N	Nº de presumíveis zigotos	Nº de estruturas clivadas
CON	27	33,33 (9/27) ^a	0,00 (0/27) ^b
MIO20	36	33,33 (9/36) ^a	16,66 (6/36) ^a
MIO30	36	13,88 (5/36) ^a	19,44 (7/36) ^a
MIO40	36	27,77 (10/36) ^a	8,33 (3/36) ^a

^{a, b} Letras minúsculas indicam comparações entre linhas ($P < 0,05$).

Estudos apontaram que houve uma intensificação e melhora no desenvolvimento dos blastômeros, quando suplementados com o mio-inositol (9). Já em outro estudo com camundongos, pôde ser observado que, quando comparado os resultados para o meio suplementado com MI em relação ao controle, o meio com MI se mostrou significativamente maior para oócitos fertilizados com dois pró-núcleos (2PN), número de embriões de 2 células e taxa de sobrevivência embrionária (10).

CONCLUSÕES

O mio-inositol influenciou positivamente a qualidade da expansão das células do cumulus e, portanto, da maturação *in vitro* de oócitos ovinos. O mio-inositol não melhorou a taxa de fecundação *in vitro* de oócitos ovinos, porém, este antioxidante incrementou a taxa de estruturas clivadas testado nestas condições experimentais.

REFERÊNCIAS

- Souza-Fabjan JMG, Locatelli Y, Duffard N, Corbin E, Touzé JL, Perreau C, et al. *In vitro* embryo production in goats: slaughterhouse and laparoscopic ovum pick up-derived oocytes
- Aureliano EKO, Lima AMC, Santos DRP, Freitas BC, Silva JM, Oliveira LKP, Lima SO, Pereira AB, Lopes IM, Silva BM, Cordeiro MF, Lopes Junior ES. Efeito do Mio-Inositol na produção *in vitro* de embriões ovinos. Vet. e Zootec. 2023; v30: 001-007.

- have different kinetics and requirements regarding maturation media. *Theriogenology*. 2014;81(8):1021-31. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.01.023.
2. Silva AAA, Silva MNP, Figueiredo LBF, Gonçalves JD, Silva MJS, Loiola MLG, et al. Quercetin influences *in vitro* maturation, apoptosis and metabolically active mitochondria of goat oocytes. *Zygote*. 2019;26(6):465-70. doi: 10.1017/S0967199418000485.
 3. Condorelli RA, La Vignera S, Bellanca S, Vicari E, Alogero AE. Myoinositol: does it improve sperm mitochondrial function and sperm motility? *Urology*. 2012;79(6):1290-5. doi: 10.1016/j.urology.2012.03.005.
 4. Mohammadi F, Ashrafi M, Zandieh Z, Najafi M, Niknafs B, Amjadi FS, et al. The effect of preincubation time and myo-inositol supplementation on the quality of mouse mii oocytes. *J Reprod Infertil*. 2020;21(4):259-68. doi: 10.18502/jri.v21i4.4330.
 5. Freitas VJF, Melo LM. *In vitro* embryo production in small ruminants. *Rev Bras Zootec*. 2010;39(Spec No):409-13. doi: 10.1590/S1516-35982010001300045.
 6. Aghaz FH, Hajarian H, Shabankareh K, Abdolmohammadi A. Effect of sericin supplementation in maturation medium on cumulus cell expansion, oocyte nuclear maturation, and subsequent embryo development in Sanjabi ewes during the breeding season. *Theriogenology*. 2015;84(9):1631-5. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.08.013.
 7. Gonzales IM, Soares AT, Gomes MGG, Sousa WH. Reprodução assistida em caprinos. In: *Anais do EMEPA; 2002; João Pessoa (PB)*. João Pessoa: EMEPA; 2002. p. 11-42.
 8. Töpfer D, Ebeling S, Weitzel J, Spannbrucker A. Effect of follicle size on *in vitro* maturation of pre-pubertal porcine cumulus oocyte complexes. *Reprod Domest Anim*. 2016;51(3):370-7. doi: 10.1111/rda.12688.
 9. Facchinetti F, Espinola MSB, Dewailly D, Ozay AC, Prapas N, Vazquez-Levin M, et al. Breakthroughs in the use of inositols for Assisted Reproductive Treatment (ART). *Trends Endocrinol Metab*. 2020;31(8):570-9. doi: 10.1016/j.tem.2020.04.003.
 10. Ravanos K, Monastra G, Pavlidou T, Goudakou M, Prapas N. Can high levels of D-chiro-inositol in follicular fluid exert detrimental effects on blastocyst quality? *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(23):5491-8. doi: 10.26355/eurrev_201712_13940.

Recebido em: 02/03/2023

Aceito em: 18/09/2023