

EFEITO DA INCLUSÃO DE ÁCIDO DOCOSAEXAENÓICO (DHA) NO MEIO DE MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS SUÍNOS

BETINA CAPELETTI¹; VERÔNICA HOYOS-MARULANDA², ANDREZ PASTORELLO BOHN³, OLENKA ROCHA PAIVA⁴, ARNALDO DINIZ VIEIRA⁵; RAFAEL GIANELLA MONDADORI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – betina.capeletti@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – verozootecnista@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – andrezbohn@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – olenkapaiva.op.op@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – vieira_ad@yahoo.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – rgmondadori@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Devido à maior presença de gotas de lipídios no citoplasma de oócitos e embriões suínos (ROMEK et al., 2011), seu zigoto apresenta maior sensibilidade à variação de temperatura na criopreservação (ZHOU & LI, 2009), portanto havendo uma menor eficiência na produção *in vitro* (PIV) de embriões suínos (MITO et al., 2015). O metabolismo lipídico desenvolve um papel relevante no desenvolvimento de embriões suínos. Os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (AGPLs), são importantes fontes de energia, em especial os da série Ômega-3, que, além disso, desempenham um papel estrutural na bicamada fosfolipídica das membranas celulares, controlando sua fluidez e mecanismos de sinalização intracelular (STILLWELL & WASSALL, 2003; CALDER et al., 2016).

O ácido docosaexaenoico (DHA) é um dos AGPLs da série Ômega-3 com maior relevância fisiológica (KURLAK et al., 1999). OS AGPLs Ômega-3 podem ser essenciais para alguns estágios de desenvolvimento embrionário em espécies com poucas reservas lipídicas, como camundongos (DOWNS et al., 2009). Além disso, os AGPLs participam da regulação da transcrição gênica (JUMP, 2008), quando usados como suplemento em procedimentos de PIV, principalmente durante a maturação *in vitro* (MIV), afetando a expressão de genes responsáveis pela formação de gotículas de lipídios (BARBER et al., 2013).

Com o intuito de melhorar o desenvolvimento embrionário através da redução do conteúdo lipídico, esse estudo buscou avaliar o efeito da adição de DHA ao meio de MIV de oócitos suínos sobre as taxas de clivagem, desenvolvimento embrionário e conteúdo lipídico de oócitos e embriões produzidos *in vitro*.

2. METODOLOGIA

Ovários de fêmeas suínas pré-púberes foram coletados em frigorífico e transportados até o laboratório em solução de cloreto de sódio 0,9% a 32°C. Fez-se a aspiração de folículos (3-6 mm) para a obtenção de *Complexos cúmulus-oócitos* (CCOs), que foram acondicionados em meio para manipulação (TCM 199 - Hepes). Somente CCOs com oócitos com o citoplasma homogêneo e totalmente envolvido por células do *cúmulus-oócitos* foram selecionados para posterior MIV.

Os CCOs foram maturados em meio de maturação (TCM 199, com 0,1% de álcool polivinílico, suplementado com FSH e LH nas primeiras 22 horas) durante 44 horas em estufa com temperatura de 38,5°C, 5% de CO₂ e umidade saturada. Grupos de 30 estruturas foram maturados em gotas de 90 µL sob óleo

mineral. O meio base foi suplementado com 10% de fluido folicular suíno (grupo controle) ou com diferentes concentrações de DHA (12,5, 25 e 50 μM).

No final do período de MIV, os CCOs foram desnudados e partenogeneticamente ativados, utilizando meios com ionomicina, estrôncio, citocalasina B e cicloheximida. Os possíveis partenotos foram cultivados *in vitro*, em gotas de 90 μL de meio PZM (+) sob óleo mineral.

Após a ativação partenogenética, as estruturas foram avaliadas para clivagem as 24 e 48 horas, como também no dia 7 para obtenção da taxa de blastocistos, que foram fixados em paraformaldeído a 4% por 15 minutos e o número de blastômeros foi contado com auxílio de Hoechst 333342 (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Além disso, utilizando a concentração de 50 μM de DHA durante a MIV, foi avaliado o conteúdo lipídico dos oócitos coletados, 22 e 44 horas após o início da MIV, bem como o de blastocistos no dia 7. As gotículas lipídicas foram avaliadas utilizando Nile Red (ROMEK et al., 2011) e a intensidade de fluorescência foi determinada com o auxílio do software Image J (FU et al., 2011).

As taxas de clivagem e de blastocisto foram analisadas com testes de qui-quadrado. Visando obter a normalidade dos dados, o número de células embrionárias e a intensidade de fluorescência foram transformados para escala logarítmica e comparadas através de análise de variância, com comparação das médias pelo teste LSD.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As taxas de clivagem de oócitos maturados em meio contendo 50 μM de DHA foram superiores ($P < 0,05$) ao grupo controle tanto às 24 horas quanto às 48 horas, conforme demonstrado na Tabela 1. O desenvolvimento até blastocisto foi similar entre todos os tratamentos. O número de células embrionárias foi maior com a menor dose de DHA, quando comparado ao grupo controle. O efeito da maior concentração de DHA foi observado somente na clivagem, não sendo observada influência nas taxas de desenvolvimento até blastocisto (Tabela 1).

Tanto oócitos quanto embriões oriundos de oócitos maturados na presença de 50 μM de DHA possuem menor conteúdo lipídico que o controle, conforme evidenciado pela Figura 1. Diferentemente do observado na taxa de blastocisto, que não foi afetada pelo tratamento, a presença do AGPI reduziu o conteúdo lipídico de embriões no sétimo dia de cultivo *in vitro*.

O efeito benéfico que ocorre na MIV na presença de DHA é provavelmente devido à redução no acúmulo de lipídios observada, dado que a comunicação entre oócitos e células do *cúmulus-oócitos* é mediada por proteínas de ligação a ácidos graxos via projeções transzonais. Ao contrário do que ocorre nas condições *in vivo*, na MIV os oócitos possuem um mecanismo que desregula as células do *cúmulus-oócitos*, o qual poderia levar ao aumento de lipídios no citoplasma do oócito (DEL COLLADO et al., 2017).

Tabela 1: Taxas de clivagem, desenvolvimento até o estágio de blastocisto e número de células embrionárias de oócitos suínos maturados *in vitro* em meio contendo diferentes concentrações de ácido docosaenoico (DHA)

DHA (µM)	Clivagem (%)		Desenvolvimento até blastocisto (%)	Número de células
	24 h	48 h		
0	32.2 (46/143) ^b	65.7 (94/143) ^b	27.3 (39/143)	26.1 ± 3.3 ^A
12.5	42.9 (60/140) ^b	72.9 (102/140) ^b	30.7 (43/140)	35.7 ± 2.3 ^C
25.0	47.6 (68/143) ^{ab}	72.7 (104/143) ^b	36.4 (52/143)	28.7 ± 2.9 ^{BC}
50.0	54.5 (78/143) ^a	76.9 (110/143) ^a	30.1 (43/143)	34.2 ± 3.4 ^{AB}

^{a,b} Frequências com letras distintas diferem estatisticamente ($P < 0.05$)

^{A,B} Médias ± Desvio padrão das médias com letras distintas diferem estatisticamente ($P < 0.05$)

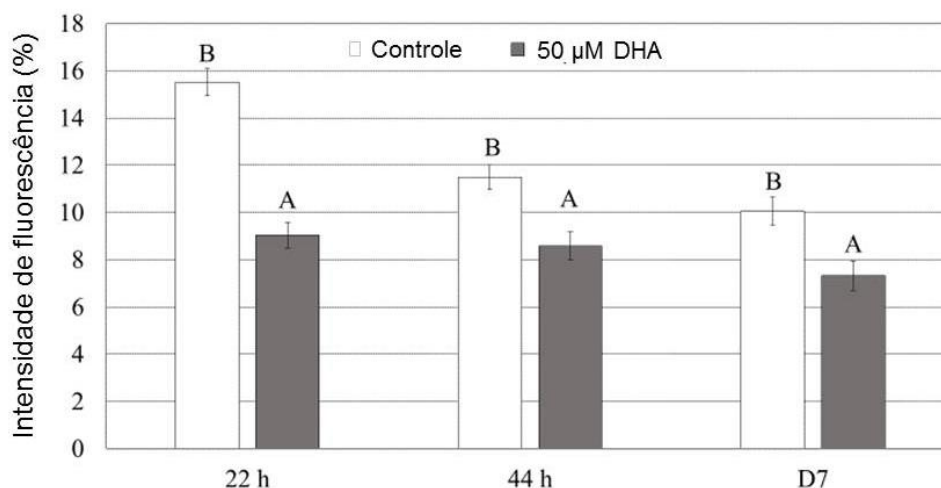


Figura 1: Intensidade de fluorescência das gotículas lipídicas (%) em oócitos suínos após 22h e 44h de MIV e de embriões no dia 7 (D7) após a ativação partenogenética. Todas as estruturas foram maturadas em meio contendo 50 µM de DHA ou em sua ausência (Controle). Letras diferentes indicam diferença estatística dentro de cada momento de avaliação.

4. CONCLUSÕES

A inclusão de DHA no meio de maturação *in vitro* de oócitos suínos na concentração de 50 µM melhorou os índices de clivagem e reduziu o conteúdo lipídico de oócitos e embriões, porém não afetou os índices de desenvolvimento até blastocisto. Mais estudos devem ser realizados visando elucidar quais rotas estão envolvidas na redução do conteúdo lipídico observada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBER, E., SINCLAIR, A. J., CAMERON-SMITH, D. Comparative actions of omega-3 fatty acids on *in vitro* lipid droplet formation. **Prostaglandins Leukot-Essent. Fatty Acids**, v. 89, p. 359-366, 2013.

CALDER, P. C. Docosahexaenoic acid. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 69, p. 8 – 21, 2016.

DEL COLLADO, M., DA SILVEIRA, J. C., SANGALLI, J. R., ANDRADE, G. M., SOUSA, L. R. S., SILVA, L. A., MEIRELLES, F. V., PERECIN, F. Fatty acid binding protein 3 and transzonal projections are involved in lipid accumulation during *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 2645-2658, 2017.

DOWNS, S. M., MOSEY, J. L., KLINGER, J. Fatty acid oxidation and meiotic resumption in mouse oocytes. **Molecular Reproduction & Development**, v. 76, p. 844–853, 2009.

FU, Y., CHUI, C. K., TEO, C. L., KOBAYASHI, E. Motion tracking and strain map computation for quasi-static magnetic resonance elastography. In: FICHTINGER, G., MARTEL, A., PETERS, T. (Eds). **Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI**. Toronto: Springer Science & Business Media, 2011. P. 433 – 440.

JUMP, D. B. N–3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. **Curr. Op. In Lipido**, v. 19, p. 242–247, 2008.

KURLAK, L. O., STEPHENSON, T. J. Plausible explanations for effects of long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) on neonates. **Archives of Disease in Childhood, Fetal and Neonatal Edition**, v. 80, p. 148–154, 1999.

MITO, T., YOSHIOKA, K., NOGUCHI, M., YAMASHITA, S., MISUMI, K., HOSHI, T., HOSHI, H. Birth of piglets from *in vitro* – produced porcine blastocysts vitrified and warmed in a chemically defined medium. **Theriogenology**, v. 84, p. 1314 – 1320, 2015.

ROMEK, M., GAJDA, B., KRZYSZTOFOWICZ, E., KEPCZYNSKI, M., SMORAG, Z. New technique to quantify the lipid composition of lipid droplets in porcine oocytes and pre-implantation embryos using Nile Red fluorescent probe. **Theriogenology**. v. 75, p. 42-54, 2011.

STILLWELL, W., WASSALL, S. R. Docosahexaenoic acid: Membrane properties of a unique fatty acid. **Chem. Phys. Lipids**, v. 126, p. 1-27, 2003.

TANGHE, S., SMET, S. Does sow reproduction and piglet performance benefit from the addition of n–3 polyunsaturated fatty acids to the maternal diet?. **The Veterinary Journal**, v. 197: 560-569, 2013.

ZHOU, G. B.; LI, N. Cryopreservation of porcine oocytes: recent advances. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, n. 5, p. 279-285, 2009.