

O ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO (DHA) NÃO ALTERA A TAXA DE MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS SUÍNOS

OLENKA ROCHA PAIVA¹; JOSÉ VICTOR CARDOSO BRAGA²; LUANA PESKE²;
ELIZA ROSSI KOMNINOU²; ARNALDO VIEIRA²; RAFAEL GIANELLA
MONDADORI³

¹ Universidade Federal de Pelotas – olenkapiva.op.op@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – bragavictor93@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – vieira_ad@yahoo.com.br

² Universidade Federal de Pelotas – elizarossikom@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – luapeske@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – rgmondadori@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O metabolismo lipídico desenvolve um papel relevante no desenvolvimento de embriões suíños, devido à maior presença de gotas de lipídios no citoplasma de oócitos deste espécie (ROMEK et al., 2011), proporcionando uma menor eficiência na produção *in vitro* (PIV) e na criopreservação de embriões suíños (MITO et al., 2015). Os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (AGPIs) são importantes fontes de energia pois 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 docosaeaxenoico (DHA) é um dos AGPIs da série Ômega-3 com maior relevância fisiológica (KURLAK et al., 1999), sendo essencial para alguns estágios de desenvolvimento embrionário em espécies com poucas reservas lipídicas, como camundongos (DOWNS et al., 2009). Além disso, os AGPIs 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 reduzir o conteúdo lipídico e melhorar a maturação e o desenvolvimento embrionário de oócitos suíños, esse estudo buscou avaliar o efeito da adição de DHA ao meio de maturação 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 salina 0,9% entre 32°C e 39°C. Fez-se a aspiração de folículos (3-6 mm) com auxílio de bomba de vácuo para a obtenção de Complexos címulos-oócitos (CCOs), que foram selecionados e lavados em meio de manipulação (TCM 199 - Hepes). Somente CCOs com citoplasma homogêneo e no mínimo três camadas de células do cumulus foram selecionados.

Após as lavagens e seleção, os CCOs foram maturados em placas Nunc contendo 400µL de meio, distribuídos entre os seguintes grupos: 1. MIV (TCM enriquecido com bicarbonato, cisteína, piruvato e EGF - controle negativo); 2 MIV + 10% fluído folicular (TCM enriquecido com bicarbonato, cisteína, piruvato, EGF

e fluído folicular - controle positivo), DHA + controle negativo (tratamento 1) e DHA + controle positivo (tratamento 2). Foram utilizados 50µM de DHA (HOYOS-MARULANDA ET AL, 2019) durante as 44h de MIV, onde nas primeiras 22h todos os grupos estavam expostos à gonadotrofinas (LH e FSH).

Ao final das 44h de MIV, os CCOs foram desnudados em vórtex por 2 minutos, lavados em PBS, fixados em paraformaldeído 4% e corados com Hoechst 333342 (7,5µg/mL) para avaliação das taxas de maturação através de microscopia de fluorescência.

As taxas de clivagem foram comparadas pelo teste de qui-quadrado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme pode ser observado na Tabela 1, todos os tratamentos tiveram taxa de maturação semelhante ($P>0.05$) após 44h de MIV.

O efeito benéfico que se esperaria na MIV na presença de DHA é provavelmente devido à redução no acúmulo de lipídios observada (HOYOS-MARULANDA ET AL, 2019), dado que a comunicação entre oócitos e células do címulus-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 címulus-oócitos, o qual poderia levar ao aumento de lipídios no citoplasma do oócito (DEL COLLADO et al., 2017).

Tabela 1: Taxas de maturação de oócitos suínos submetidos a diferentes tratamentos.

	Tratamentos			
	Controle Negativo (%)	Controle Positivo	DHA+MIV	DHA +pFF
Taxa de maturação	56.92 (37/65)	68 (51/75)	56.86 (29/51)	67.16 (45/67)

4. CONCLUSÕES

Os dados demonstram que a utilização de 50µM de DHA no meio MIV, com ou sem a adição de 10% de fluído folicular, não afeta os índices de maturação de oócitos suínos.

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.
- 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.
- HOYOS-MARULANDA, V. et al. Effects of polyunsaturated fatty acids on the development of pig oocytes in vitro following parthenogenetic activation and on the lipid content of oocytes and embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 205, n. April, p. 150–155, 2019.