

## INFLUÊNCIA DA MATURIDADE SEXUAL SOBRE A MATURAÇÃO NUCLEAR DE OÓCITOS DE FÊMEAS SUÍNAS

**SANTOS, Elisa Caroline da Silva<sup>1,2</sup>; CASTRO, Natália Ávila<sup>2,3</sup>; GONÇALVES, Alexander de Oliveira<sup>2</sup>; PRADIEÉ, Jorgea<sup>2</sup>; LUCIA JUNIOR, Thomaz<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Doutoranda em Biotecnologia- UFPel; <sup>2</sup>ReproPel- Faculdade de Veterinária- UFPel; <sup>3</sup>Graduanda em Medicina Veterinária- UFPel; [elisa\\_css@hotmail.com](mailto:elisa_css@hotmail.com)

### 1 INTRODUÇÃO

A maturação *in vitro* (MIV) é uma etapa fundamental para que o oócito adquira competência para ser fertilizado e obtenha suporte para o desenvolvimento embrionário precoce (Krisher *et al.*, 2007). A qualidade dos oócitos coletados para a produção *in vitro* de embriões suínos é, portanto, um fator determinante para o sucesso do protocolo utilizado.

Oócitos de fêmeas pré-púberes e púberes se diferem em diversos aspectos (Pawlak *et al.*, 2011). Ao coletar-se oócitos imaturos ocorrem alterações fisiológicas que resultam em menor competência de desenvolvimento em comparação com os oócitos coletados após maturação *in vivo*. Em fêmeas pré-púberes, os oócitos apresentam maiores taxas de polispermia e originam menor percentual de blastocisto do que oócitos de fêmeas sexualmente maduras (Bagg *et al.*, 2004).

Em suínos, a maturação incompleta, ou seja, a deficiência ou ausência de algum fator necessário para o desenvolvimento do oócito se manifesta como uma diminuição da capacidade fertilizante além da reduzida capacidade de desenvolver-se até o estágio de blastocisto (Singh *et al.*, 1997). Embora a maturação nuclear *in vitro* possa ser concluída com sucesso, uma variedade de outros processos que ocorrem dentro do citoplasma do oócito são necessários para que se obtenha competência fertilizante. O êxito na conclusão destes eventos é independente da maturação nuclear, sendo que são coletivamente denominados "maturação citoplasmática" (Eppig *et al.*, 1996).

Segundo Brüssow *et al.* (2002), fêmeas púberes são doadoras de oócitos de melhor qualidade para a biotécnica de fertilização *in vitro* do que as fêmeas pré-púberes e primíparas. Os autores verificaram maior quantidade de folículos nos ovários das fêmeas maduras sexualmente, além de ter sido observado maior competência meiótica nos oócitos destas.

A alta incidência de polispermia e a baixa formação de blastocistos são importantes entraves para o sucesso da produção de embriões suínos *in vitro* (Coy e Romar, 2002). Estes entraves podem ocorrer devido à maturação incompleta devido à má qualidade dos oócitos. (Abeydeera, 2001; Krisher *et al.*, 2007).

Neste contexto, existe a necessidade de pesquisas que avaliem a qualidade oocitária de fêmeas púberes e pré-púberes. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a competência na maturação nuclear de oócitos provenientes de fêmeas suínas púberes e pré-púberes.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ovários das fêmeas suínas foram coletados em abatedouro localizado na cidade de Pelotas. Após a coleta, os ovários foram conduzidos ao laboratório na temperatura de 30 °C em solução salina 0,9% acrescida de gentamicina. A punção dos complexos *cumulus oophorus* (CCO's) foi realizada a partir de folículos entre 3-6 mm, através de agulha 21 G conectada a um sistema de vácuo. Os CCO's foram lavados 3 vezes em meio de lavagem PigPel HEPES (NaCl 100 mM, KCl 10 mM, frutose 0,5 mM, myo inositol 2,77 mM, NaHCO<sub>3</sub> 5mM, HEPES 25 mM, glicina 10 mM, tri sódio citrato 0,34 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,35 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,4 mM, NaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 1,71 mM, phenol red 4 µM, 0,00005 g/ml, lactato de sódio xarope 60% 5,35 mM, ácido pirúvico 0,2 mM, EDTA 0,01 mM).

Após o procedimento de lavagem, os CCO's foram classificados morfológicamente. Somente CCO's grau 1, com citoplasma homogêneo e com camadas de cumulus completas e densas, foram utilizados neste experimento. Finalizada a classificação, os CCO's foram colocados no meio NCSU-23 para a realização da maturação.

Foram utilizados 120 CCO's, sendo 66 de fêmeas pré-púberes (ausência de corpo lúteo) e 54 de fêmeas púberes (presença de corpo lúteo). Para a MIV foram adicionados 40 CCO's por gota de 400 µl. Nas primeiras 24 h a MIV foi conduzida em meio contendo como aditivos: EGF (10 ng/ml), LH (5 µg/ml), FSH (5 µg/ml), AMP-c (0,1 mM) e fluido folicular suíno (10%). Decorrido esse período permaneceram por mais 24 h, no mesmo meio, porém, sem hormônios e sem AMP-c.

Decorridas 48 h os oócitos foram desnudados através de pipetagem para avaliação da maturação nuclear com Hoeschst (Sigma<sup>®</sup> H33342), por meio de microscopia de epifluorescência. Foram classificados como maduros os oócitos em metáfase II (MII). Os dados foram comparados pelo teste qui-quadrado através do software *Statistix* 2008.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho avaliou a influência da maturidade sexual da doadora do oócito sobre a taxa de maturação nuclear oocitária. Foi observado que do total de 120 oócitos analisados, 46 haviam sofrido maturação nuclear, sendo que destes, 25 (25,3%) foram provenientes de fêmeas suínas pré-púberes e 21 (20,7%) de fêmeas púberes, não havendo diferença estatística significativa entre os grupos (Tabela 1).

Sabe-se que oócitos provindos de fêmeas de abatedouro são muito heterogêneos, em termos de qualidade e competência. Sendo que, a qualidade é de extrema importância para bons resultados na produção de embriões *in vitro* (Gupta *et al.*, 2008). Ademais, aproximadamente 80% das fêmeas suínas abatidas comercialmente apresentam idade entre seis e sete meses. Embora seja essa a idade de entrada à puberdade, a ovulação ocorre em apenas algumas das fêmeas (Pawlak *et al.*, 2011).

A maturação nuclear dos oócitos, avaliada no presente trabalho, não apresentou diferença de acordo com a maturidade sexual das fêmeas. Este resultado está de acordo com Bagg *et al.* (2004) e Gupta *et al.* (2008), os quais não observaram diferenças nas taxas de maturação meiótica, clivagem e formação de

blastocisto em oócitos de marrãs pré-púberes e púberes. Pawlak *et al.* (2011), ao contrário, demonstraram a existência de diferenças na competência meiótica de fêmeas púberes (62,1% dos oócitos em estágio MII de maturação) e pré-púberes (25%). Ademais, eles avaliaram também outras características dos oócitos, como tamanho e taxa de fertilização *in vitro*, e assim, afirmaram que fêmeas suínas púberes apresentam oócitos de melhor qualidade.

O meio de maturação utilizado foi acrescido de hormônios e aditivos, EGF, AMP-c e PFF, o que pode ter feito com que o período reprodutivo da fêmea não influenciasse o potencial de maturação *in vitro*. Entretanto, a taxa de maturação encontrada neste trabalho foi inferior em ambas fêmeas com relação a taxa encontrada por Pawlak *et al.*, (2011). No entanto, para poder confirmar estes resultados, faz-se necessário que seja realizada a fecundação *in vitro*. Pois, a habilidade na formação do pronúcleo masculino, de embriões monospermicos, de desenvolvimento embrionário, assim como, a qualidade embrionária, pode ser influenciada pela maturidade sexual da fêmea (Gupta *et al.*, 2008).

Tabela 1. Taxa de maturação nuclear de oócitos suínos de acordo com a maturidade sexual das fêmeas.

Maturidade sexual	Maturação oocitária	
	Imaturos n (%)	Maturados n (%)
Pré-púberes	41 (40,7)	25 (25,3)
Púberes	33 (33,3)	21 (20,7)

\*P>0,05

#### 4 CONCLUSÃO

Até o presente momento, este trabalho não apresentou correlação entre a maturidade sexual de fêmeas suínas e a taxa de maturação nuclear dos oócitos. São necessários outros testes, como a fecundação *in vitro*, para confirmação deste resultado.

#### 5 REFERÊNCIAS

ABEYDEERA L.R. In vitro fertilization and embryo development in pigs. **Reproduction Supplement**, v. 58, p.159–73, 2001.

BAGG, M.; VASSENA, R.; PAPASSO-BRAMBILLA, E.; GRUPEN, C. G.; ARMSTRONG, D. T., 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**, v. 62, p. 1003-1011, 2004.

BRÜSSOW, K. P.; RÁTKY, J.; TORNER, H., EGERSEGI, I.; SCHNEIDER, F.; SOLTI, L.; TUCHSCHERER, A. Follicular and oocyte development in gilts of different age. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 50, p. 101–110, 2002.

COY, P. & ROMAR, R. In vitro production of pig embryos: a point of view. **Reproduction Fertility Development**, v. 14, p. 275-286, 2002.

EPPIG, J.J.; O'BRIEN, M.; WIGGLSWORTH, K. Mammalian oocyte growth and development in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 44, p. 260–273, 1996.

GUPTA, K. M.; UHM, S. J.; LEE, H. T. Sexual maturity and reproductive phase of oocyte donor influence the developmental ability and apoptosis of cloned and parthenogenetic porcine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 108, p. 107–121, 2008.

KRISHER, R. L.; BRAD, J.R.; HERRICK, M.L.; SPARMAN, J.E.; SWAIN, A. A comparative analysis of metabolism and viability in porcine oocytes during in vitro maturation. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p.72-96, 2007.

PAWLAK, P.; RENSKA, N.; PERS-KAMCZYC, E.; WARZYCH, E. The quality of porcine oocytes is affected by sexual maturity of the donor gilt. **Reproductive Biology**, v.11, n.1, p.1-18, 2011.

SINGH, B.; MENG, L.; RUTLEDGE, J.M., ARMSTRONG, D.T. Effects of epidermal growth factor and follicle stimulating hormone during in vitro maturation on cytoplasmic maturation of porcine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.46, p. 401–407, 1997.