

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

PROGRESSÃO MEIÓTICA NA MATURAÇÃO NUCLEAR *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS DE OVÁRIOS COM E SEM A PRESENÇA DE CORPO LÚTEO

Janaina C. Medeiros FONSECA*¹, Leandro Polato LAZARI¹, Matheus montanari de SOUZA¹, Leandro Francisco da SILVA¹, Leticia Zamberlan PISTILLO¹, Andresa Aparecida de Oliveira CARDOSO¹, Caliê CASTILHO¹, Sheila Merlo GARCIA¹.

*autor para correspondência: janainamfonseca@gmail.com

¹Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, Brasil

Abstract: PIVE has been used for the technique of embryo production, allowing the best use of the animals, having as the improvement of the races. This work aimed to evaluate the progression in nuclear maturation of oocytes from slaughterhouse ovaries with and without the presence of CL. 100 ovaries were aspirated from which 709 oocytes were selected, 334 of G I (with CL-CCL) and 375 of G II (without CL-SCL), and four control groups (immature oocytes), with 20 ovaries in each replicate, and 10 of each group resulted in an average of 7.09 oocytes per ovary. Of the oocytes aspirated 445 were matured, 209 of the CCL group and 236 of the SCL group, duly classified. From this total, 367 oocytes were analyzed, with a loss of 17.5% of the oocytes in the slide assembly process and from the total (367), 27% and could not be classified and not placed in the analysis. The presence or absence of LC did not affect the nuclear maturation of ovarian cells from slaughterhouse. It can be said that regardless of ovarian type and oocyte grade (I, II and III), these oocytes are fit for PIVE.

Palavras-chave: Females, *In Vitro* fertilization, Productivity, Zebuines.

Introdução

Visando o aumento da produtividade em rebanhos, a PIVE, dentre as várias biotécnicas da reprodução, tem sido amplamente utilizada no Brasil. Em virtude de seus bons resultados e inúmeros benefícios, essa técnica vem contribuindo para

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

acelerar o aprimoramento das raças e seus cruzamentos (ARRUDA et al., 2001). Esse processo, principalmente para fins de pesquisa, pode ser feito por meio de ovários oriundos de abatedouro, onde são muitas as variáveis que interferem na qualidade dos oócitos, podendo ser a presença ou ausência do corpo lúteo (CL) uma delas.

O CL é uma glândula endócrina que se forma no ovário após uma ovulação, e contribui para a regulação do ciclo estral e manutenção da gestação (PENITENTE-FILHO et al., 2014), e tem sido utilizado como critério de seleção para aspiração folicular em bovinos (PIRESTANI et al., 2011). No entanto, sua relação com a qualidade dos oócitos recuperados ainda não está bem esclarecida, apresentando resultados controversos.

Os mecanismos celulares envolvidos na maturação *in vitro* (MIV) e portanto, aquisição de competência do oócito imaturo para a PIVE, também não são bem descritos e necessitam de mais estudos e pesquisas. Dentre os processos da MIV, merece atenção a fase de maturação nuclear. Segundo Penitente Filho et al. (2013), essa fase permite que os oócitos que se encontram em prófase I, retomem a meiose e atinjam a fase de metáfase II (MII), e adquiram a competência para serem fecundados e, assim, iniciem a embriogênese (SMITZ et al., 2004).

Logo, este trabalho teve como objetivo avaliar a progressão meiótica na maturação nuclear de oócitos provenientes de ovários de abatedouro, com e sem a presença de CL.

Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido no laboratório de PIVE da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE – Campus II. Foram utilizados 100 ovários de fêmeas bovinas sem raça definida. Os ovários foram transportados para o laboratório em garrafa térmica contendo solução salina a 0,9% de NaCl, à 37°C. No laboratório os

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

ovários foram lavados e separados em dois grupos experimentais: com a presença de CL (CCL) e sem a presença de CL (SCL).

Os folículos visíveis com diâmetro de 2–8 mm foram aspirados, e os oócitos selecionados e classificados de acordo com o aspecto morfológico dos CCO's, segundo Lonergan et al. (2003), em 5 grupos de qualidade: Grau I, II, III (considerados viáveis) e Desnudo ou Atrésicos (inviáveis).

Para maturação (MIV), grupos com no máximo 30 oócitos viáveis de cada grau (I, II e III), foram depositados separadamente em gotas contendo meio de maturação e mantidos em estufa, à temperatura de 39°C, em atmosfera gasosa de 5% de CO₂ em ar e com máxima umidade, por um período de 22 a 24 horas.

Para a coloração do núcleo os oócitos, foram desnudados, fixados, permeabilizados e corados com 10 µg/mL de Hoechst (33342, Sigma Co., St. Louis, EUA) por 10 minutos. Feito o processo de coloração, os oócitos foram transferidos para lâminas de vidro, e avaliados quanto à progressão meiótica, em microscópio de epifluorescência (Olympus - IX-51, objetiva de 40x, excitação 330-385nm e emissão 420-490nm para o Hoechst). A classificação dos estádios de maturação nuclear foi avaliada segundo Hewitt e England (1997) em: vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI), metáfase II (MII) ou degenerado/anucleado (D).

Os dados foram analisados através de testes não-paramétricos por meio do teste Qui-quadrado (χ^2) ao nível de significância de 5% e as comparações múltiplas pelo teste exato de Fisher, mediante software estatístico BioEstat 5.3.

Resultados e Discussão

Foram aspirados 100 ovários dos quais selecionou-se 709 oócitos totais, sendo 334 do grupo CCL e 375 do grupo SCL. Realizou-se quatro repetições, com 20 ovários em cada repetição, sendo 10 de cada grupo. Resultando assim, uma

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

média de 7,09 oócitos por ovário. Para avaliação de progressão meiótica utilizou-se um total de 129 e 146 oócitos para os grupos CCL e SCL respectivamente.

A Tabela 01, indica para cada grupo experimental a progressão meiótica dos oócitos classificados como viáveis, de acordo com o aspecto morfológico. Oócitos em MII mostram que ocorreu maturação nuclear, característica altamente desejável na PIVE. Pode-se observar as seguintes porcentagens de oócitos em MII, respectivamente para os grupos CCL e SCL: 41,17% e 63,63% (oócitos de grau I), 54,28% e 43,58% (grau II) e 59,01% e 41,17% (grau III). Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) ao comparar, dentro de cada grupo, a taxa de maturação nuclear dos oócitos classificados em grau I, II e III, bem como quando comparados os oócitos de d entre os grupos. Esses resultados mostram que independente do grau de qualidade oocitária e grupo experimental, houve uma boa taxa de maturação nuclear, e baixa porcentagem de oócitos nas fases de VG, QVG, MI e degenerados.

Tabela 1 – Valores percentuais da avaliação da progressão meiótica na maturação nuclear de acordo com o grupo experimental e o grau do oócito.

Grupo	Fase da maturação nuclear					
	VG	QVG	MI	MI I	Degenerados	Total
CCL						
I	1 (2,94%)	2 (5,88%)	12 (35,29%)	14 (41,17%)	4 (11,76%)	34
II	3 (8,57%)	0 (0,00%)	12 (34,28%)	19 (54,28%)	1 (2,85%)	35
III	3 (4,19%)	3 (4,91%)	13 (21,31%)	36 (59,01%)	6 (9,83%)	61
p valor			0,2682			
SCL						
I	0 (0,00%)	2 (9,09%)	5 (22,72%)	14 (63,63%)	1 (4,54%)	22
II	3 (7,69%)	3 (7,69%)	13 (33,33%)	17 (43,58%)	3 (7,69%)	39
III	12 (14,11%)	7 (8,23%)	27 (31,76%)	35 (41,17%)	4 (4,7%)	85
p valor			0,3605			

Na Tabela 02 agrupou-se os oócitos como não maturados (VG, QVG, MI e degenerados) e maturados (MI I). Foi possível observar que 46,52% e 54,80% dos

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

oócitos dos grupos CCL e SCL respectivamente, não apresentaram maturação nuclear e que 53,48% dos oócitos do grupo CCL e 45,20% dos oócitos do grupo SCL atingiram a MII, não havendo diferença estatística ($p > 0,05$) entre as variáveis analisadas.

Tabela 2 – Valores percentuais da avaliação de oócitos maturação e não maturados de acordo com o grupo experimental.

Grupo	Maturação nuclear		
	Não maturados	Maturados	Total
CCL	60 (46,52%)	69 (53,48%)	129
SCL	80 (54,80%)	66 (45,20%)	146
p valor		0,1703	

O trabalho de Reis et al. (2006) demonstra que na raça holandesa há diferenças entre ovários com e sem CL e conclui que as vacas com CL apresentaram melhor desempenho que as vacas sem a presença de CL, em relação ao número e a qualidade de oócitos coletados dos dois ovários. No presente trabalho, por se tratar de ovários de abatedouro, não é possível caracterizar as raças e idades, justificando possíveis diferenças nos resultados encontrados.

Machatková et al. (2004) concluíram que ocorre melhor PIVE quando se utilizam oócitos aspirados durante o predomínio de CL no ciclo estral. Porém ao se analisar todas as etapas, os oócitos provenientes da fase de crescimento folicular de ovários sem CL obtiveram um melhor resultado.

No presente trabalho, ao utilizar ovários oriundos de abatedouro, sem raça e idade definida, não houve diferença ($p < 0,05$) em relação a quantidade e qualidade de oócitos de ovários com e sem a presença de CL. Podendo-se dizer que independentemente do tipo de ovário e grau oocitário (I, II e III), esses oócitos estariam aptos para pesquisas que envolvem a produção *in vitro* de embriões.

Conclusão

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

A presença ou ausência do CL não afeta a quantidade, qualidade e progressão meiótica de oócitos viáveis de ovários provenientes de abatedouro.

Referências

ARRUDA, R. P., et al. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embriões equinos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** [online]. 2001, v. 38, n.5, p. 233-239.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T. e BOLAND, M. P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Domest Anim*, **County Dublin**, v. 38, p. 259-267, 2003.

SMITZ, J. E. J.; NOGUEIRA, D.; VANHOUTTE MATOS, D. G.; CORTVRINDT, R. N. Oocyte: in vitro maturation. In: Suh CS, Sonntag B, Erickson GF. The ovarian life cycle: a contemporary view. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 3, p. 5-12, 2004.

PENITENTE-FILHO, J. M., JIMENEZ, C. R., ZOLINI, A. M., CARRASCAL, E., AZEVEDO, J. L., SILVEIRA, C. O., & TORRES, C. A. A. (2015). Influence of corpus luteum and ovarian volume on the number and quality of bovine oocytes. **Animal Science Journal**, 86(2), 148-152.

PIRESTANI, A., HOSSEINI, S. M., HAJIAN, M., FOROUZANFAR, M., MOULAVI, F., & ABEDI, P. (2011). Effect of ovarian cyclic status on in vitro embryo production in cattle. **International Journal of Fertility & Sterility**, 4(4), 172-175.

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:

