



AVALIAÇÃO DO ACÚMULO DE LIPÍDEOS EM OÓCITOS DE VACAS GIR (*BOS INDICUS*) E HOLANDESA (*BOS TAURUS*)

João Gabriel Viana de Grázia¹, Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista², Luis Sérgio de Almeida Camargo¹, Raul Marcel Gonzalez Garcia³, Lilian Tamy Iguma¹ & João Henrique Moreira Viana¹

1 - Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG; 2 - Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução, Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Ceará, Fortaleza, CE; 3 - Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG.

Palavras-chave: lipídeos, oócitos, *Bos indicus*, *Bos Taurus*

INTRODUÇÃO

Oócitos da maioria das espécies de mamíferos são sensíveis a baixa temperatura (LEIBO *et al.*, 1995). Em algumas espécies, a baixa taxa de sobrevivência após o descongelamento tem sido associada à presença do alto conteúdo lipídico intracitoplasmático presente no oócito (YOUNG *et al.*, 1994). VISINTIN *et al.*, (2002) e STEEL *et al.*, (2004) relataram maior taxa de prenhez após a transferência de embriões congelados de *Bos indicus* em relação a *Bos taurus*, possivelmente devido ao maior número e tamanho de gotículas lipídicas presentes no embrião de *Bos indicus* quando comparado com *Bos taurus* no estágio de blastocisto (VISINTIN *et al.*, 2002). Dentre os fatores que podem influenciar o conteúdo lipídico intracitoplasmático de embriões pode-se destacar a origem do oócito (raça da doadora).

Nile Red é um corante fluorescente usado para marcar de forma específica as gotículas lipídicas intracelulares em oócitos (GENICOT *et al.*, 2005) e embriões (BATISTA *et al.*, 2010). Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi comparar o conteúdo lipídico em *Bos taurus* (Holandês) e *Bos indicus* (Gir), utilizando este corante.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Campo Experimental Fazenda Santa Mônica, localizado no Município de Valença, RJ e no Campo Experimental de Coronel Pacheco, localizado no município de Coronel Pacheco, MG, ambos pertencentes à Embrapa Gado de Leite.

Coleta de oócito

Para a realização do presente estudo, os complexos *cumulus*-oócitos (COCs) foram recuperados de 9 vacas, sendo 6 vacas da raça Gir (*Bos taurus*) e 3 da raça Holandesa (*Bos indicus*), com condições corporais semelhantes. A aspiração folicular foi realizada com auxílio de ultrassom, transdutor setorial intravaginal de 7,5 MHz e uma guia para agulha de biópsia (Scanner 100S Pie Medical, Maastricht, Holanda). O líquido folicular e os COCs foram coletados em um tubo de 50 mL aquecido com meio DPBS (Nutricell, Campinas, SP, Brasil) e suplementado com 5% de soro fetal bovino (Nutricell) e 10UI/mL de heparina sódica (Liquemine, Roche, Basileia, Suíça). Foram selecionados os complexos *cumulus*-oócitos (COCs) de grau I e II de acordo com Viana *et al.* (2004). Imediatamente após a seleção, os oócitos foram removidos do *cumulus* com 1% de hialuronidase (Sigma). Os oócitos desnudos foram lavados duas vezes em PBS acrescidos de 0,1% de PVA (Sigma).

Coloração da amostra



Os oócitos livres das células do *cumulus* foram fixados em solução de 500 μ l 2% glutaraldeído e 2% formaldeído, por pelo menos 24h. Decorrido esse tempo, foram transferidos para tubos de plásticos (1 oócito/frasco plástico) contendo 30 μ L de 10 μ g / ml de *Nile Red* (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, E.U.A.) dissolvido em solução fisiológica (0,9% NaCl) com 1mg/ml de polivinilpirrolidona. As amostras foram coradas no escuro a temperatura ambiente por 24 horas. A solução de *Nile Red* estoque (1mg/ml) foi preparada por diluição em DMSO e armazenada à temperatura ambiente no escuro. A concentração final foi obtida diluindo o estoque com a solução salina com 1mg/ml de polivinilpirrolidona.

Quantificação da fluorescência

As gotículas de lipídeos foram visualizadas usando um microscópio fluorescência com objetiva de 10x. A quantidade de luz fluorescente emitida por toda amostra (oócito) foi avaliada em 582 ± 6 nm com um microscópio de fluorescência invertido usando a objetiva de 10x. A fluorescência foi quantificada utilizando *Software* QUANTPORO. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência. O filtro de luz UV foi utilizado para evitar o branqueamento.

Análise estatística

Os resultados obtidos da intensidade de fluorescência emitida pelo oócito foram submetidos ao teste de Lilliefors e Cochran & Bartlett para verificação de normalidade e homogeneidade de variâncias respectivamente, antes de serem submetidos à análise de variância (ANOVA) para avaliar a diferença estatística a nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Todos os complexos *cumulus*-oócitos de *Bos taurus* (n=16) e *Bos indicus* (n= 25) foram recuperados pela técnica de punção folicular guiada por ultrassonografia e submetidos à quantificação de lipídeos utilizando o corante *Nile Red*, como demonstrado na Figura 1. O resultado da média da intensidade de fluorescência dos oócitos de *Bos taurus* e *Bos indicus*, após a coloração com *Nile Red*, está representado na Figura 2. Não foi observada diferença estatística significativa entre os dois tratamentos, onde a média da intensidade de fluorescência foi de 67,26 e 65,16 (unidade arbitrária de fluorescências) para *Bos taurus* e *Bos indicus*, respectivamente. O resultado demonstrado sugere que a diferença no conteúdo lipídico nos embriões de *Bos indicus* e *Bos taurus*, observada durante o estágio de blastocisto, não é influenciada pelo conteúdo lipídico oriundo do oócito.

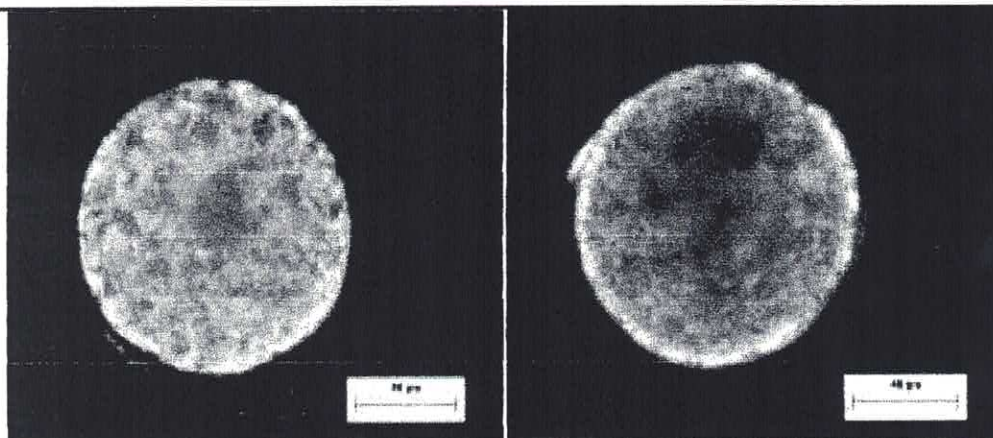


Figura 1: Esquerda - oócito de vaca Gir (*Bos indicus*) corado com Nile Red.
Direita - oócito de vaca holandesa (*Bos taurus*) corado com Nile Red.

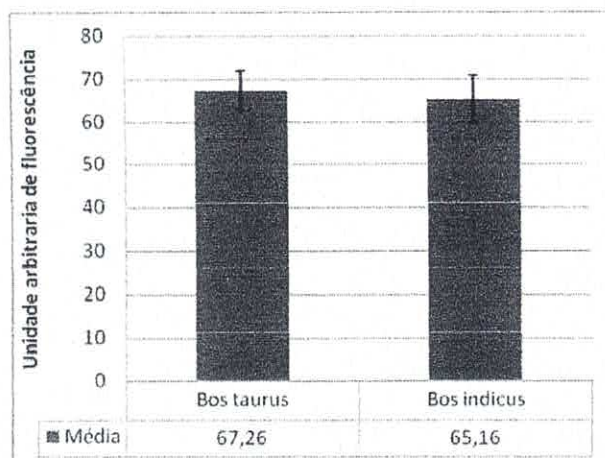


Figura 2: Média da intensidade de fluorescência dos oócitos imaturos de *Bos taurus* e *Bos indicus*. Resultados expressos como média \pm erro

CONCLUSÃO

A comparação do conteúdo lipídico nos oócitos de *Bos taurus* (Holandês) e *Bos indicus* (Gir), utilizando o corante *Nile Red*, não revelou diferença significativa entre as duas raças.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GENICOT, G., J.L. LEROY, A.V. SOOM & I. DONNAY. 2005. The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. **Theriogenology**, 63:1181-1194.
- LEIBO, S.P.; POLLARD, J.W. & A. MARTINO. 1995. Chilling and freezing sensitivity of "reassembled" in vitro-derived bovine embryos. **Theriogenology**, 43:265. (Abstr.).
- STEEL, R. AND J.F. HASLER. 2004. Pregnancy rates resulting from transfer of fresh and frozen Holstein and Jersey embryos. **Reproduction Fertility Development**, 16:182-183. (Abstr.).



VISINTIN, J.A.; MARTINS, J.F.; BEVILACQUA, E.M.; MELLO, M.R.; NICACIO, A.C. & M.E. ASSUMPCAO. 2002. Cryopreservation of *Bos taurus* vs. *Bos indicus* embryos: Are they really different? **Theriogenology**, 57:345-359.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; FERREIRA, A.M.; AS, W.F.; FERNANDES, A.C. & A.P. MARQUES-JR. 2004. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal Reproduction Science**, 84: 1-12.

YOUNGS, C.R.; KNIGHT, T.J.; BATT, S.M. & D.C. BEITZ. 1994. Phospholipid, cholesterol, triacylglycerol and fatty acid composition of porcine blastocysts. **Theriogenology**, 41:343. (Abstr.).