

MATURAÇÃO NUCLEAR DE OÓCITOS BOVINOS SUPLEMENTADOS OU NÃO COM SORO DE VACAS EM DIFERENTES PERÍODOS PÓS-PARTO

LETICIA FRANCO COLLARES¹; BRUNA MION²; PAULO ANTUNES DA ROSA²;
JOAO ALVARADO RINCÓN²; LIGIA MARGARETH CANTARELLI PEGORARO³;
MARCIO NUNES CORREA²

¹Universidade Federal de Pelotas – leticiacollares@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – brunamion.vet@gmail.com

³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - ligia.pegoraro@embrapa.br

²Universidade Federal de Pelotas – marcio.nunescorrea@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A seleção genética e os avanços na nutrição visando o aumento da produção leiteira ocasionaram um declínio na fertilidade das fêmeas. Vacas leiteras de alta produção desenvolvem um status de balanço energético negativo (BEN) no periparto, em decorrência do maior requerimento nutricional pelo feto e a ingestão de matéria seca (MS) não ser suficiente para suprir as necessidades individuais (ESPOSITO *et al.*, 2015).

O BEN no pós-parto afeta de forma negativa a fertilidade, estando associado a falhas na ovulação e redução na pulsatilidade de LH. Além disso, promove redução nas concentrações de insulina, IGF-I e glicose, levando a um aumento nas concentrações de beta-hidroxibutirato (BHBA) e ácidos graxos não esterificados (NEFA). Os altos níveis de NEFA no fluido folicular levam a uma falha na maturação oocitária e diminuem a viabilidade das células da granulosa e da teca (CHEONG *et al.*, 2015).

Essas flutuações metabólicas e endócrinas levam a uma menor capacidade de desenvolvimento do oócito e subsequente embrião. Para se obter um gameta apto para fecundação, o oócito deve passar por uma série de processos críticos durante a transição de estágio de folículo primordial até o desenvolvimento de folículo pré-ovulatório (O'DOHERTY *et al.*, 2014). Além disso, essas flutuações podem alterar o resultado de técnicas reprodutivas, como a produção *in vitro* de embriões.

A etapa da maturação *in vitro* (MIV) é um processo complexo, pelo qual o oócito imaturo precisa adquirir a competência para ser fecundado e se desenvolver até estágio de embrião (COSTA *et al.*, 2016). Portanto, as condições da MIV exercem grande impacto na produção de embriões bovinos, incluindo efeitos na maturação nuclear, clivagem e taxa de produção de blastocisto (RODRIGUES-CUNHA *et al.*, 2015).

Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da adição de soro sanguíneo inativado de vacas leiteiras no pós-parto recente e no final da lactação no meio de maturação sobre as taxas de maturação nuclear de oócitos bovinos.

2. METODOLOGIA

Foram coletados ovários de fêmeas bovinas provenientes de abatedouros locais, transportados para o Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Clima Temperado em recipiente térmico com NaCl 0,9% acrescido de gentamicina (0,04%) a temperatura de 30°C.

Os complexos *cumulus oophoros* (COCs) foram obtidos a partir da aspiração de folículos de 2-6 mm de diâmetro. A aspiração foi realizada com auxílio de bomba à vácuo acoplada a agulha 19 G com pressão de 10-12 mmHg e o conteúdo aspirado foi depositado em tubos Falcon® de 15 mL previamente esterilizados. Após a sedimentação foi realizada a busca e seleção dos COCs através de lupa estereoscópica, considerando o grau de compactação das células do *cumulus* e o grau de homogeneidade do citoplasma como critérios de qualidade oocitária. Os oócitos selecionados de grau I e II foram divididos aleatoriamente em três tratamentos, contendo 40 COCs cada: T₀: soro ovino usado como controle endógeno, T₁: soro de vacas com 10,8 ± 4,8 dias pós-parto (pp); T₂: soro de vacas com 354 ± 3,8 dias pp. Posteriormente, os COCs foram incubados em estufa à 39 °C com 5% de CO₂ durante 24h no meio de maturação (TCM 199 Gibco®, adicionado de LH/FSH (1%), piruvato (0,033mmol) e antibióticos) enriquecido com soro (10%) %conforme os tratamentos.

Após o período de maturação *in vitro*, os oócitos passaram por desnudamento para a retirada das células do *cumulus* através de sucessivas pipetagens. Os oócitos desnudados foram fixados por 15 min em gotas de 400 µL de paraformaldeído, separados de acordo com os tratamentos e armazenados em 400 µL de Triton a 4° C para posterior avaliação da maturação nuclear.

A avaliação de maturação nuclear foi realizada no Laboratório de Reprodução Animal (ReproPel) da Universidade Federal de Pelotas. Para realização da análise, os oócitos foram corados com Hoechst (15 µm/mL) durante 10 min, fixados com Mowiol® e avaliados em microscópio de fluorescência conforme os estágios de maturação: Vesícula Germinativa (VG), Quebra de Vesícula Germinativa (QVG), Primeira fase da Meiose (MI), Anáfase, Telófase e Segunda fase da Meiose (MII).

Para a análise dos resultados, os oócitos foram divididos em dois grupos: maduros e imaturos. Foram considerados como maduros, os oócitos que atingiram o estágio de MII após 22 horas de cultivo e considerados imaturos aqueles que após esse período permaneceram nos estágios de RGV e MI, conforme metodologia descrita por WOUDEMBERG *et al.* (2012).

Os dados foram tabelados e avaliados pelo teste de qui-quadrado, pelo programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho mostraram que não houve diferença entre os grupos avaliados no número de oócitos que atingiram a fase de MII e foram considerados como maduros (p= 0,39), conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1: Fases de maturação nuclear após a MIV de oócitos bovinos

Tratamento	Nº de oócitos	RVG n (%)	MI n (%)	Telófase n (%)	MII n (%)
T0	68	7 (11,5)	6 (9,8)	1 (1,6)	47 (77,0)
T1	65	4 (6,8)	4 (6,8)	0 (0,0)	51 (86,4)
T2	72	3 (4,5)	10 (15,2)	1 (1,5)	52 (78,8)

A avaliação da maturação nuclear de oócitos em diferentes intervalos determina a eficiência no procedimento de maturação *in vitro* (PRENTICE-BIENSCH *et al.*, 2012). Para que o oócito torne-se apto para a fecundação, são necessárias algumas modificações como proliferação e diferenciação de organelas citoplasmáticas, síntese e armazenamento de proteínas e mRNA, para que este retome e complete a meiose (O'DOHERTY *et al.*, 2014).

Esperava-se que a suplementação com soro de vacas em diferentes períodos metabólicos no meio de maturação atrasaria o desenvolvimento dos oócitos cultivados *in vitro*, uma vez que no pós-parto de vacas leiteiras, o ambiente metabólico adverso leva a alterações na esteroidogênese e no perfil transcricional dos folículos ovarianos (O'DOHERTY *et al.*, 2014). Nessas fases há um aumento na liberação de corpos cetônicos, como o BHBA, e de NEFA. Altas concentrações desses componentes alteram a qualidade oocitária (MATOBA *et al.*, 2012). Além disso, estudos mostram um efeito tóxico direto do BHBA na maturação *in vitro* de oócitos (CHAPINAL *et al.*, 2012), diminuindo os resultados da produção *in vitro* de embriões.

Diversos estudos têm mostrado os efeitos negativos do NEFA sobre os parâmetros reprodutivos. Experimentos *in vitro* têm mostrado que uma elevada concentração de NEFA durante a fase final de maturação de oócitos bovinos é prejudicial para o desenvolvimento do oócito, aumentam o estresse oxidativo e subsequente qualidade embrionária (VALCKX *et al.*, 2014). Em um estudo realizado por JORRISTSMA *et al.* (2004), os oócitos que foram expostos a elevadas concentrações de NEFA tiveram mais lenta progressão da meiose, menor taxa de fecundação, clivagem e produção de blastocistos quando comparados a oócitos que não foram expostos a esse componente. Outrossim, as altas concentração de NEFA em cultivo de células do cumulus induzem a um aumento nas taxas de apoptose e necrose celular (LEROY *et al.*, 2005).

4. CONCLUSÕES

A suplementação com soro de vacas no pós-parto recente e no final da lactação não alterou as taxas de maturação nuclear. Contudo, outros estudos são necessários para avaliar se a adição dos soros no meio de MIV altera outros parâmetros, como qualidade oocitária, refletindo em menores taxas de desenvolvimento embrionário inicial.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHAPINAL, N., CARSON, M, E., LEBLANC, S, J., LESLIE, K, E., GODDEN, S., CAPEL, M., SANTOS, J, E, P., OVERTON, M, W., DUFFIELD, T, F. The association of serum metabolites in the transition period with Milk production and early-lactation reproductive performance. Canadá. **American Dairy Science Association**. v. 95, p. 1301-1309, 2012.

CHEONG, S., SÁ FILHO, O, G., ABSALÓN-MEDINA, V, A., PELTON, S, H., BUTLER, W, R., GILBERT, R, O. Metabolic and Endocrine Differences between Dairy Cows that Do or Do Not Ovulate First Postpartum Dominant Follicles. **Journal Dairy Science**. v. 95, 2015.

ESPOSITO, G., IRONS, P., WEBB, E, C., CHAPWANYA, A. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune

response in transition dairy cows. **Animal Reproduction Science**. África do Sul.v. 144, p. 60-71, 2014.

JORRITSMA, R., CÉSAR, M, L., HERMANS, J, T., KRUITWAGEN, C, L, J, J., VOS, P, L, A, M., KRUIP, T, A, M. Effects of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cells and developmental potential of oocytes in vitro. **Animal Reproduction Science**. Holanda. v. 81, p. 225-235, 2004.

LEROY, J, L, M, R., VANHOLDER, T., MATEUSEN, B., CHRISTOPHR, A., OPSOMER, G., KRUIF, A., GENICOT, G., SOOM, A, V. Non-esterified fatty acids in follicular fluido f dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. Bélgica. **Reproduction**. v. 130, p. 485-495, 2005.

MATOBA, S., O'HARA, L., CARTER, F., KELLY, A, K., FAIR, T., RIZOS, D., LONERGAN, P. Irlanda. The association between metabolic parameters and oocyte quality early and late postpartum in Holstein dairy cows. **American Dairy Science Association**. v. 95, p. 1257-1266, 2012.

O'DOHERTY, A, M., O'GORMAN, A., NAIB, A., BRENNAN, L., DALY, E., DUFFY, P., FAIR, T. Negative energy balance affects imprint stability in oocytes recovered from postpartum dairy cows. **Genomics**. Irlanda.v.104, p. 177-185, 2014.

PRENTICE-BIENSCH, J, R., SINGH, J., ALFOTEISY, B., ANZAR,M. A simple and high-throughput method to assess maturation status of bovine oocytes: Comparison of anti-lamin A/C-DAPI with na aceto-orcein staining technique. **Theriogenology**. Canada.v.78, p.1633–1638, 2012.

RODRIGUES-CUNHA, M, C, V., MESQUITA, L, G., BRESSAN, F., COLLADO, M., BALIEIRO, J, CC., SCHWARZ, K, RL., CASTRO, F, C., WATANABE, O, Y., WATANABE, Y, F., COELHO, L, A., LEAL, C, LV. Effects of melatonin during in vitro maturation in defined medium on oocyte meiosis, oxidative stress and subsequent embryo development. **Theriogenology**, Brasil. Accepted Manuscript.

VALCKX, S, D, M., HOECK, V, V., ARIAS-ALVAREZ, M., MAILLO, V., LOPEZ-CARDONA, A, P., GUTIERREZ-ADAN, A., BERTH, M., CORTVRINDT, R., BOLS, P, E, J., LEROY, J, L, M, R. Elevated non-esterified fatty acid concentrations during in vitro murine follicle growth alter follicular physiology and reduce oocyte developmental competence. Bélgica. **American Society for Reproductive Medicine**. v. 102. 2014.