

INFLUÊNCIA DA QUALIDADE MORFOLÓGICA DOS COMPLEXOS OÓCITO-CUMULUS NA MATURAÇÃO NUCLEAR E NAS TAXAS DE BLASTOCISTO BOVINOS

Michele Munk Pereira^{1,8}; Sabine Wohlfres-Viana^{2,8}; Mariana Cortes Boité^{3,8}; Bruno Campos de Carvalho⁴; Ríbrion Ivan Tavares Pereira Batista^{1,8}; Gustavo Bruno Mota^{5,8}; Raquel Varela Serapião^{6,8}; Juliana Polisseni^{2,8}; João Henrique Moreira Viana⁷; Luiz Sérgio Almeida Camargo⁷

¹ Estudante de Ciências Biológicas do CES-JF;

² Estudante de Pós-Graduação da UFJF;

³ Estudante de Pós-Graduação da UFF;

⁴ Pesquisador Epamig;

⁵ Estudante de Pós-Graduação da UFV;

⁶ Estudante de Pós-Graduação da UENF;

⁷ Pesquisador da Embrapa Gado de Leite;

⁸ Estagiário Embrapa Gado de Leite. e-mail: mimunckjf@yahoo.com.br

Palavras-chave: COCs, morfologia, embriões bovinos.

INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma importante ferramenta para a produção de animais de alto valor genético, proporcionando a obtenção de maior número de descendentes em curto intervalo de tempo. Além disso, essa biotécnica é utilizada na pesquisa de modelos experimentais e conservação de animais em risco de extinção.

Nesse contexto, o Brasil destaca-se na utilização da PIVE na pesquisa e, principalmente, para fins comerciais que visam atender o setor pecuário (FERREIRA *et al.*, 2004). Assim, é necessário aprimorar essa biotecnologia, composta das etapas de maturação *in vitro* dos oócitos (MIV), de fecundação *in vitro* (FIV) e de cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões. Dessas, destaca-se o processo de MIV, visto que as demais fases da PIVE dependem da quantidade de oócitos maturados e de seu potencial de desenvolvimento (DIELEMAN *et al.*, 2002).

Os oócitos de mamíferos permanecem na prófase da primeira divisão meiótica e, sob estímulo apropriado, retomam a meiose com quebra da vesícula germinativa, término da primeira divisão e nova parada em metáfase da segunda divisão meiótica (LIANG *et al.*, 2007). Nessa fase, o oócito maduro está apto a ser fecundado e completar a segunda divisão meiótica, com a extrusão do segundo corpúsculo polar. Devido a esses fatos, a qualidade da maturação e a habilidade dos

oócitos em reassumir a meiose influenciam diretamente o desenvolvimento embrionário, afetando assim a sobrevivência da prole (SIRARD *et al.*, 2006).

Na MIV, os complexos oócito-células do *cúmulus* (COC's) geralmente são recuperados de ovários de animais provenientes de matadouro ou de aspiração folicular guiada por ultra-sonografia e são rotineiramente classificados levando em consideração apenas aspectos morfológicos. Portanto, é importante analisar a maturação nuclear e o potencial de desenvolvimento de COCs de diferentes qualidades morfológicas, permitindo assim um aumento no número total de embriões produzidos na PIVE. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da qualidade morfológica dos COCs na maturação nuclear e nas taxas de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite. Os oócitos foram obtidos de ovários bovinos oriundos do matadouro de Juiz de Fora. Folículos com diâmetro entre 2–8 mm foram aspirados. Os COCs (n= 2.174) recuperados foram mantidos em meio *TALP-Hepes* para seleção morfológica em estereomicroscópio, classificados em função do número de camadas de células da granulosa (VIANA *et al.*, 2004), e separados em três grupos para a MIV: G1 (grau I - > três camadas de células do *cúmulus*, n=1.077); G2 (grau II - uma a três camada de células do *cúmulus*, n=444), G3 (grau III - parcialmente desnudos, n=335). A MIV foi realizada em poços contendo 400µl de meio TCM-199 (Gibco), acrescido de 10% de soro de vaca em cio e 20µg/ml de FSH por 24 horas. Após a MIV, alguns oócitos dos G1 (n=78), G2(n=143), G3(n=116) foram desnudados por agitação em vórtex, fixados em lâmina em solução de metanol e ácido acético (3:1) por 12 horas e, posteriormente corados com orceína acética a 1%. Os oócitos foram observados sob microscopia óptica de imersão (1000x) imediatamente após a coloração e classificados como: metáfase II (MII) - cromossomos haplóides condensados, com a presença do corpúsculo polar; metáfase I (MI) – cromossomos bivalentes condensados; não definido (ND) - oócitos não identificados na fase da meiose devido a presença de células do *cúmulus*; Degenerado (DG) - oócitos vacuolizados, não sendo possível a visualização dos cromossomos;

O restante dos COCs de G1 (n=999), G2 (n=301) e G3 (n=219), foram fecundados *in vitro* em gotas de 100 µl de meio *Fert-Talp* acrescido de heparina, com concentração de $2,0 \times 10^6$ espermatozóides/ml por 22 horas. Os possíveis zigotos foram cultivados em poços com 400µl de meio CR2aa acrescido de 10% de soro fetal bovino (WILKINSON *et al.*, 1996). Os processos de MIV, FIV e CIV foram submetidos à estufa com 5% de CO₂, 38,0 °C e 95% de umidade.

A avaliação da taxa de clivagem foi realizada de 48 a 72 horas após a fecundação. As taxas de produção de blastocistos dos grupos G1, G2, G3 foram avaliadas no sétimo dia do cultivo (D7). Nesse mesmo dia, blastocistos dos três grupos foram submetidos à coloração de Giemsa (LIM *et al.*, 1994) para determinação e comparação do número total de células. Os embriões foram lavados em meio tamponado acrescido de 10% de soro fetal bovino e transferidos para solução de citrato de sódio 0.9%, onde permaneceram por um período de 10 minutos. Passada esta etapa, os embriões foram transferidos para solução de fixação contendo metanol, ácido acético e água destilada, na proporção de 3:2:1, onde permaneceram por um minuto. Em seguida, os embriões foram transferidos para lâmina, corados com solução de Giemsa e observados, sob microscopia óptica, para a contagem de células.

As taxas de maturação, clivagem e produção de blastocistos foram analisadas pelo teste Qui-quadrado e o número total de células embrionárias por análise de variância, com as médias comparadas por SNK.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No G1, 89,74% dos oócitos corados apresentaram-se em MII (Figura 1), 6,41% em MI, e 3,84% NI. Não houve oócitos degenerados. No G2, 81,11% dos oócitos estavam em MII, 8,39% em MI, 4,19% DG e 6,29% NI, enquanto que no G3 87,06% dos oócitos encontravam-se em MII, 8,62% em MI, 0,86% DG e 3,44% NI. Não houve diferença entre os grupos ($P>0,05$) quanto às taxas de metáfase II (Figura 2) e metáfase I. FAIR *et al.* (1995) encontraram resultados semelhantes, quando observaram que a grande maioria dos oócitos maturados *in vitro* (75 a 95%) progridem até metáfase II após 24 horas de cultivo. No entanto, as condições *in vitro* comprometem a maturação citoplasmática, podendo acarretar diminuição na capacidade de desenvolvimento dos oócitos maturados *in vitro*, em comparação com os maturados *in vivo* (LONERGAN *et al.*, 2003).

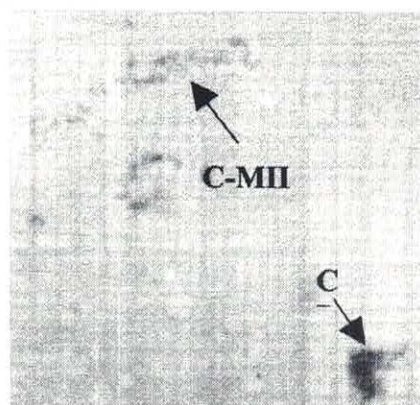


Figura 1: Micrografia de oócito em metáfase II (C-MII – cromossomos haplóides em metáfase II; CP- corpúsculo polar).

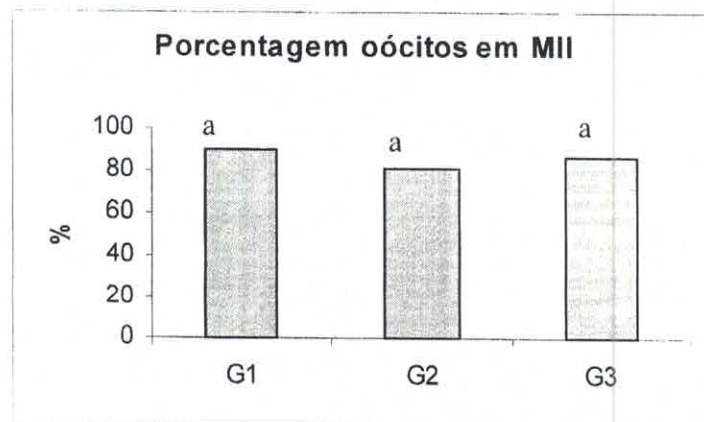


Figura 2: Porcentagem de oócitos maturados em metáfase II (MII) de acordo com sua qualidade morfológica. Valores não diferem entre si ($P > 0,05$).

Na Figura 3 observa-se que não houve diferença ($P > 0,05$) na taxa de clivagem entre os grupos G1 (46,4%) e G2 (40,8%). No entanto, o grupo G3 (36,5%) foi semelhante ($P > 0,05$) ao G2, mas inferior ao G1 ($P < 0,05$). Com relação à taxa de blastocistos, o G1 (22,4%) foi superior ($P < 0,05$) aos G2 e G3 (10,6% e 13,6%, respectivamente).

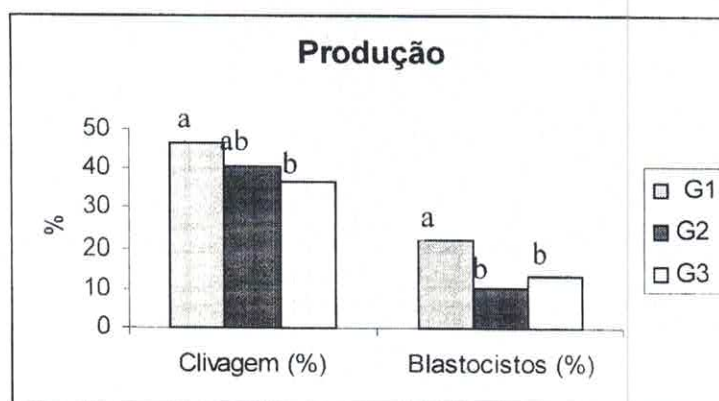


Figura 3: Taxa de clivagem e blastocisto, coluna com letras diferentes diferem entre si ($P < 0,05$).

Na contagem de células, não houve diferença ($P > 0,05$) no número total de células entre blastocistos oriundos dos G1 ($138,5 \pm 10,5$), G2 ($147,5 \pm 9,8$) e G3 ($122,5 \pm 13,1$) (figura 4).

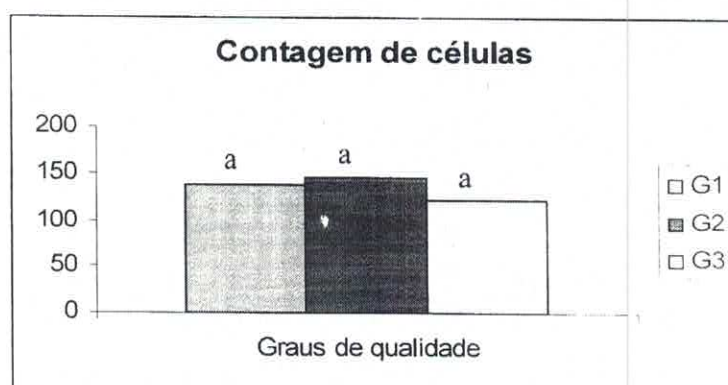


Figura 4: Contagem do número total de células embrionárias, de acordo com a qualidade morfológica dos oócitos maturados. Valores não diferem entre si ($P > 0,05$).

A redução na taxa de blastocisto observadas nos grupos G2 e G3, pode estar relacionada à qualidade da maturação citoplasmática e não a nuclear, já que a maioria dos oócitos dos três grupos analisados completaram a maturação nuclear após o processo de MIV. Esse fato sugere assincronia entre as maturações nuclear e a citoplasmática, o que influencia de forma significativa as taxas de produção de embriões bovinos *in vitro* (LONERGAN *et al.*, 2003).

Desta forma, pode-se concluir que a utilização de oócitos G1, G2 e G3, segundos critérios morfológicos de avaliação não estão diretamente relacionados ao sucesso da maturação nuclear, porém afetam o desenvolvimento embrionário.

AGRADECIMENTOS

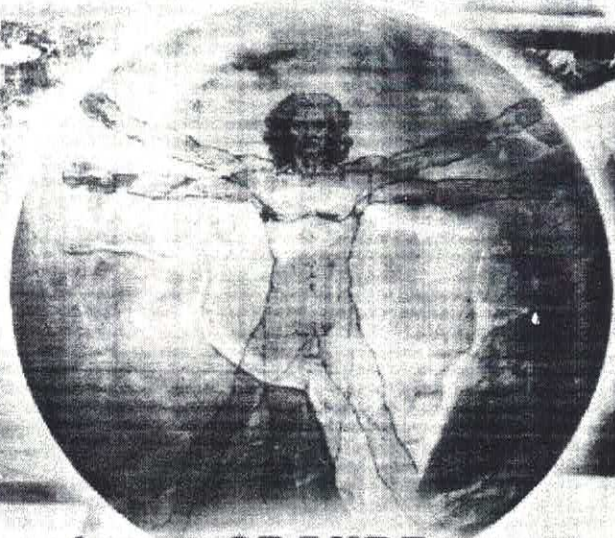
Agradecemos, a Embrapa Gado de Leite pelo apoio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DIELEMAN, S. J.; HENDRIKSEN, P. J. M.; VIUFF, D.; THOMSEN, P. D.; HYTTEL, P.; KNIJN, H. M.; WRENZYCKI, C.; KRUIP, T. A. M.; NIEMANN, H.; GADELLA, B. M.; BEVERS, M. M.; VOS, P. L. A.M. Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pré-implantation embryos. *Theriogenology*, v.57, n.1, p.5-20, 2002.
- FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Molecular Reproduction and Development*, v. 42, p.437-442, 1995.
- FERREIRA, A. M.; VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A.; SÁ, W. F.; PEREIRA, P. A. C. População Folicular Ovariana Durante o Ciclo Estral em Vacas da Raça Gir. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, n.6, p.1689-1694, 2004.
- LIANG, C.G.; SU, Y.Q.; FAN, H.Y.; SCHATTE, H.; SUN, Q.Y. Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. *Molecular Endocrinology*, v.29, p. 1-46, 2007.
- LIM, J.M.; OKITSU, O.; OKUDA, K.; NIVA, K. Effects of fetal calf serum in culture medium on development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, v.41, p.1091-1098, 1994.
- LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T. BOLAND, M.P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reproduction in Domestic Animals*, v.38, n.4, p.259-267, 2003.
- SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, v. 65, p.126-136, 2006.
- VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L. S. A.; FERREIRA, A. M.; SA, W. F.; FERNANDES C. A. C.; JUNIOR, A.P.M. 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*, v 84, n. 1-2, p. 1-12, 2004.
- WILKINSON R..F., MING R., ANDERSONZ B,BUNCH T.D. AND WHITE K.L. The Use Of Neural Networks In Developing Novel Embryo Culture Media-Formulations. *Theriogenology*, v. 45, p.41-49, 1996.

XXX SEMANA DE BIOLOGIA

O MUNDO SE TORNOU PEQUENO PARA VOCÊ



MAS VOCÊ NÃO É GRANDE PARA O MUNDO

- > XIII MOSTRA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA
- > V FEIRA MUNICIPAL DE CIÊNCIAS
- > II MOSTRA DE PALEOBIODIVERSIDADE
- > MINI-CURSOS

> CICLO DE PALESTRAS:

- BIÓLOGIA
- DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL
- FRAGMENTAÇÃO FLORESTAL
- CORREDORES ECOLÓGICOS
- AGROECOLOGIA
- MODELO DE DESENVOLVIMENTO
- PROTOCOLO DE KYOTO

INSCRIÇÕES: a partir de 01 de outubro
no DA de Biologia ICB - UFJF

INFORMAÇÕES: samuelo2007@gmail.com
Tel.: 88297442/88143888/88364606/9946.812

APÓIO:



ICB
Instituto de Ciências Biológicas

UFJF
Universidade Federal de Juiz de Fora

Ministério do Meio Ambiente
Departamento de Recursos Hídricos

REALIZAÇÃO:

cbio

7!