



PROGRESSÃO DA MEIOSE, VIABILIDADE DAS CÉLULAS DO CUMULUS E ABUNDÂNCIA DO TRANSCRITO GDF-9 EM OÓCITOS BOVINOS SUBMETIDOS A DIFERENTES AMBIENTES DE MATURAÇÃO *IN VITRO*

Michele Munk Pereira¹; Raquel Varella Serapião³; Paulo Henrique Campos Junior²; Marco Antônio Machado⁴; João Henrique Moreira Viana⁴; Luiz Sérgio Almeida Camargo⁴

¹ Estudante de Pós-Graduação da UFJF; ² Estudante de Ciências Biológicas do CES/JF; ³ Bolsista de Pós-doutorado da Embrapa Gado de Leite; ⁴ Pesquisador da Embrapa Gado de Leite.

E-mail: mimunckjf@yahoo.com.br

Palavras-chave: atmosfera gasosa, álcool polivinílico, soro.

INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotecnologia que pode ser aplicada no tratamento de infertilidade, preservação de espécies ameaçadas de extinção, transferência nuclear, produção de animais transgênicos e multiplicação de rebanhos bovinos geneticamente superiores (ANDRABI e MAXWELL, 2007; GILCHRIST e THOMPSON, 2007). Dentre as diversas etapas envolvidas na PIVE, a maturação *in vitro* (MIV) merece destaque, visto que a qualidade dos complexos *cumulus* oócitos (COCs) é fundamental para a produção de embriões (SIRARD *et al.*, 2006). A maturação dos COCs inclui modificações nucleares, citoplasmáticas e a expansão das células do *cumulus*. Estas etapas são influenciadas pela suplementação dos meios de maturação e atmosfera gasosa (WATSON *et al.*, 2000; BANWELL *et al.*, 2007).

O soro de vaca em cio (SVC) é rotineiramente utilizado como suplementação proteica na MIV, pois contém hormônios e fatores de crescimento (ALI, BILODEAU e SIRARD, 2003). Todavia, o soro contém compostos indefinidos (esteróides, colesterol e peptídeos) que alteram o metabolismo, a criotolerância e a abundância de transcritos (RIZOS *et al.*, 2003). Uma alternativa pode ser a substituição do soro por macromoléculas sintéticas como o álcool polivinílico (PVA), possibilitando o estabelecimento de um sistema de maturação definido (LIM *et al.*, 2007).

A atmosfera gasosa geralmente utilizada na MIV é de 5% de CO₂, e 20% de O₂ em ar (BAVISTER, 1995). Contudo, a tensão de O₂ no fluido folicular e na tuba uterina é menor (1,5 a 8,5%) quando comparado ao ar atmosférico (20%) (BANWELL *et al.*, 2007). A alta tensão de O₂ pode prejudicar o desenvolvimento dos COCs pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que causam danos celulares (UEDA *et al.*, 2002). Estes danos incluem alteração no fuso mitótico que podem diminuir a taxa de oócitos que atingem a metáfase II (ZUELKE *et al.*, 1997), além de alterar a abundância de transcritos importantes para o desenvolvimento do oócito e das células do *cumulus* (KATZ-JAFFE *et al.*, 2009). Assim, a quantificação do transcrito (fator de crescimento e diferenciação 9 – GDF9), relacionado com a expansão do *cumulus* (EPPIG, 2001) pode ser utilizada para monitoramento dos sistemas de MIV.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes sistemas de maturação na maturação nuclear, viabilidade do *cumulus* e na abundância do transcrito GDF9 em oócitos bovinos maturados *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= 996) recuperados foram separados em quatro grupos para a MIV: G1 (0,1% PVA em 20% de O₂; n=257); G2 (10% SVC em 20% de O₂; n= 251), G3 (0,1% PVA em 5% de O₂; n= 243) e G4 (10% SVC em 5% de O₂; n= 245). A MIV foi realizada em meio TCM-199 (Gibco), em estufa com 5% CO₂ a 38.5°C por 24 horas. Após a MIV, alguns oócitos dos G1 (n=42), G2(n=36), G3(n=38), G4(n=35) 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 identificados (NI) - oócitos não identificados na fase da meiose devido à presença de células do *cumulus*; Degenerado (DG) - oócitos vacuolizados, não sendo possível a visualização dos cromossomos.

O restante dos oócitos teve suas células do *cumulus* removidas com 1% de hialuronidase, em meio Talp Hepes. Posteriormente, as células do *cumulus* foram submetidas à coloração com o Azul de Tripán que avalia a integridade da membrana celular (JEWGENOW *et al.*, 1998). O número de células coradas em azul representou o número de células inviáveis da amostra. Essas células coradas foram visualizadas e mensuradas com auxílio de microscópio óptico. Para a quantificação em PCR em tempo real foi utilizado três *pools* de 10 oócitos para cada grupo. Os *primers* GDF9 e β -actina (controle endógeno) foram desenhados a partir de sequências disponíveis no banco de dados do *GenBank* e estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Sequência dos *primers* específicos, temperaturas de pareamento, tamanho dos produtos e fonte de acesso às sequências no *GenBank*

Produto	Sequência do <i>primer</i>	Temperatura de pareamento	Tamanho do produto (pb)	Nº de acesso no <i>GenBank</i> /Referência
GDF9	F 5'GACCCCTAAATCCAACAGAA3' R 5'AGCAGATCCACTGATGGAA3'	53°C	120	NM-174681
β -ACTINA (endógeno)	F 5'GACATCCGCAAGGACCTCTA3' R 5'ACATCTGCTGGAAGGTGGAC3'	53°C	205	NM_173979

A extração do RNA total foi realizada utilizando-se o kit comercial RNeasy MicroKit (Qiagen). A produção dos cDNAs foi realizada por transcrição reversa utilizando o kit comercial *SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix* (Invitrogen, Califórnia, USA). A quantificação do cDNA foi realizada utilizando a metodologia de PCR em tempo real. As reações foram feitas utilizando-se o kit comercial *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). As taxas de maturação nuclear e viabilidade das células do *cumulus* foram analisadas pela ANOVA, com as médias comparadas por SNK. O *software* REST® (versão 384) foi utilizado para analisar os dados obtidos da quantificação relativa do PCR em tempo real.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No G1, 72,53% dos oócitos corados apresentaram-se em MII (Figura 1), 11,86% em MI, 6,98% NI e 8,62% Degenerados. No G2, 74,89% dos oócitos estavam em MII, 7,20% em MI, 8,14% NI e 9,76% DG, enquanto que no G3 72,39% dos oócitos encontrava-se em MII, 6,73% em MI, 3,70% NI e 17,7% DG, e no G4 72,22% dos oócitos encontravam-se em MII, 12,22% em MI, 10,00% NI e 5,56% DG. Não houve diferença entre os grupos ($P>0,05$) quanto às taxas de metáfase II e metáfase I (Tabela 2). De forma similar, Mizushima e Fukui (2000) não observaram diferença na maturação nuclear entre oócitos maturados com ou sem soro. A habilidade dos oócitos em reassumir a meiose influencia diretamente no potencial de desenvolvimento do oócito (SIRARD *et al.*, 2006). Todavia, no presente experimento a tensão de oxigênio e a suplementação com SVC ou PVA não alteraram a meiose dos oócitos maturados *in vitro*.

Tabela 2: Efeito da suplementação e tensão atmosférica nas taxas de maturação nuclear de oócitos maturados *in vitro*.

Tratamentos ¹	N	II (%)	MI (%)	Não Identificados (%)	Degenerados (%)
G1	42	72,53±0,12	11,86±0,22	6,98±0,91	8,62±0,86
G2	36	74,89±0,20	7,20±0,73	8,14±0,93	9,76±0,77
G3	38	72,39±0,06	6,73±0,72	3,70±1,41	17,7±0,27
G4	35	72,22±0,08	12,22±0,46	10,00±0,86	5,56±0,75

¹ Valores não diferem entre os tratamentos (Anova; $P>0,05$). Os resultados estão demonstrados em média e $\pm$ erro padrão. G1 (0,1% PVA em 20% de O₂); G2 (10% SVC em 20% de O₂); G3 (0,1% PVA em 5% de O₂) e G4 (10% SVC em 5% de O₂). PVA (álcool polivinílico) e SVC (soro de vaca no cio). As análises foram realizadas após 3 repetições.

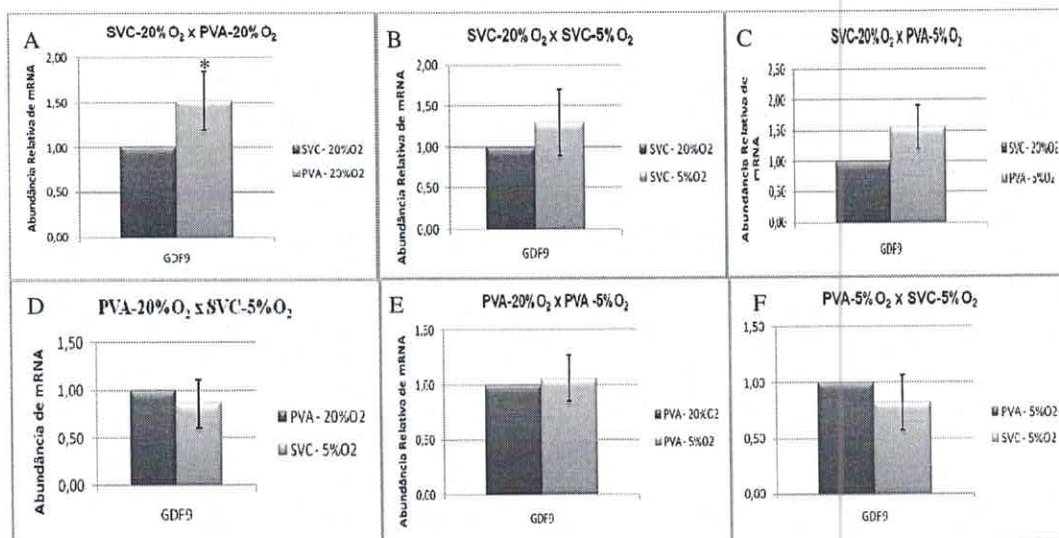


Figura 3 Abundância Relativa do transcrito relacionado a expansão do cumulus (GDF9) em oócitos maturados *in vitro* suplementados com SVC (soro de vaca no cio) ou PVA (álcool polivinílico) em 20% ou 5% de O₂. A: SVC-20%O₂xPVA-20%O₂; B: SVC-20%O₂xSVC-5%O₂; C: SVC-20%O₂xPVA-5%O₂; D: PVA-20%O₂xSVC-5%O₂; E: PVA-20%O₂xPVA-5%O₂; F: PVA-5%O₂xSVC-5%O₂. Os resultados estão demonstrados em média e $\pm$ erro padrão. Diferenças significativas entre os grupos são indicados por * $P < 0,05$. As análises foram realizadas com 9 replicatas.

No entanto, outros estudos devem ser realizados para comprovar essa hipótese.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos, a Embrapa Gado de Leite, CNPq, FAPEMIG e CAPES pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, A.; SIRARD, M.A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. *Biology of Reproduction*, v. 66, p. 901-905, 2002.
- ALI, A.A.; BILODEAU, J.F.; SIRARD, M.A. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology*, v.59, p. 939-949, 2003.
- ANDRABI, S.M.H.; MAXWELL, W.M.C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Animal Reproduction Science*, v. 99, p. 223-243, 2007.
- BANWELL, K.M.; LANE, M.; RUSSELL, D.L.; KIND, K.L.; THOMPSON, J.G. Oxygen concentration during mouse oocyte in vitro maturation affects embryo and fetal development. *Human Reproduction*, v. 22, n.10, p. 2768-2775, 2007.
- BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: Facts and artifacts. *Human Reproduction Update*, v.1, n. 2, p. 91-148, 1995.
- EPPIG, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, v. 122, n. 6, p. 829-838, 2001.
- GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology*, v. 67, p. 6-15, 2007.
- JEWGENOW, K.; PENFOLD, L.M.; MEYER, H.H.; WILDT, D.E. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 112, n. 1, p. 39-47, 1998.
- KATZ-JAFFE, M.G.; MCCALLIE, B.R.; PREIS, K.A.; FILIPOVITS, J.; GARDNER, D.K. Transcriptome analysis of in vivo and in vitro matured bovine MII oocytes. *Theriogenology*, v. 71, p 939-946, 2009.
- LEYENS, G.; KNOOPS, B; DONNAY, I. Expression of peroxiredoxins in bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, v. 69, p. 243-251, 2004.



Observou-se, mediante avaliação morfológica, que após MIV os oócitos maturados com SVC em alta (20%) ou em baixa (5%) tensão de O_2 apresentaram uma maior expansão das células do *cumulus* do que os oócitos suplementados com PVA (Figura 1). A maior expansão das células no *cumulus* de oócitos maturados com soro pode ser explicada pelos fatores de crescimento que existem nesse composto e podem estimular a expansão dessas células *in vitro* (SENBON *et al.*, 2004). Deste modo, observou-se que a adição de soro estimula a expansão dessas células e este fato não está relacionado com a tensão de O_2 .

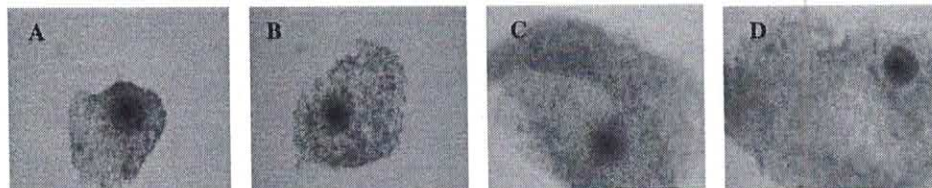


Figura 1. Expansão das células do *cumulus* após maturação *in vitro* de oócitos previamente selecionados com mais de três camadas de células e citoplasma homogêneo. Tratamentos – A: G1 (0,1% PVA em 20% de O_2); B: G3 (0,1% PVA em 5% de O_2); C: G2 (10% SVC em 20% de O_2), e D: G4 (10% SVC em 5% de O_2). PVA (álcool polivinílico) e SVC (soro de vaca no cio). Aumento: 40X.

No entanto, quando as células do *cumulus* foram submetidas à coloração com o corante Azul de Tripán não foram encontradas diferenças significativas ($P>0,05$) na viabilidade das células entre os diferentes tratamentos (Figura 2). Ali e Sirard, (2002) observaram que a expansão do *cumulus* não é fundamental para a melhora da competência de desenvolvimento de oócitos bovinos. Provavelmente, isto ocorre, pois mesmo com pouca expansão as células continuam viáveis, não prejudicando o desenvolvimento do oócito.

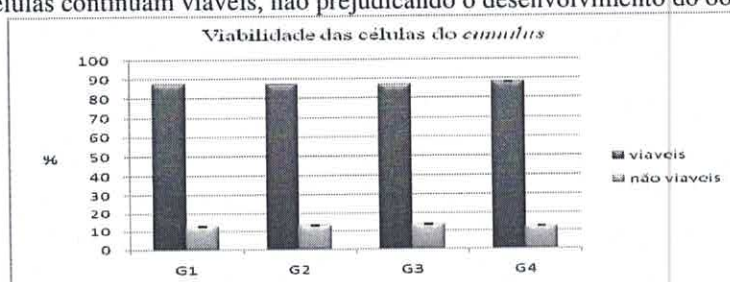


Figura 2. Viabilidade das células do *cumulus* pela técnica de coloração com Azul de tripan. G1 (0,1% PVA em 20% de O_2); G2 (10% SVC em 20% de O_2), G3 (0,1% PVA em 5% de O_2) e G4 (10% SVC em 5% de O_2). PVA (álcool polivinílico) e SVC (soro de vaca no cio). Não houve diferença significativa entre os tratamentos (Anova; $P>0,05$). As análises foram realizadas após 5 repetições.

Quando foi avaliada a abundância relativa do transcrito de GDF9, os oócitos maturados com PVA e em 20% de O_2 , apresentou uma maior abundância ($P<0,05$) do que o SVC (Figura 3A). Não houve diferença ($P>0,05$) na abundância desse transcrito nas outras comparações realizadas (Figura 3B, 3C, 3D, 3E, 3F).

Deste modo, em alta tensão de O_2 o transcrito de GDF9 foi mais abundante no tratamento suplementado com PVA do que com SVC, que teve maior expansão do *cumulus*. Fatores presentes no soro estimulam a expansão das células do *cumulus in vitro* (SENBON *et al.*, 2004) assim como a proteína de GDF9 secretada pelo oócito no ambiente de maturação, por indução da síntese de ácido hialurônico (EPPIG, 2001). Os resultados sugerem que na ausência de soro e presença de alta tensão de oxigênio seja necessário de maior produção de GDF9 por parte do oócito visando a expansão, mesmo que parcial, das células do *cumulus*, em parte para suprir a deficiência de fatores que seriam fornecidos pelo soro.



- LIM, K.T.; JANG, G.; KO, K.H.; LEE, W.W.; PARK, H.J.; KIM, J.J.; LEE, S.H.; HWANG, W. S.; LEE, B.C; KANG, S.K. Improved in vitro bovine embryo development and increase efficiency in producing viable calves using defined media. *Theriogenology*, v. 67, p. 293-302, 2007.
- MIZUSHIMA, S.; FUKUI, Y. Fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined maturation medium. *Theriogenology*, v. 55, p. 1431-1445, 2000.
- RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of Reproduction*, v. 68, p. 236-243, 2003.
- SENBON, S.; FUKUMI, Y.; HAMAWAKI, A.; YOSHIKAWA, M.; MIYANO, T. Bovine oocytes grown in serum-free medium acquire fertilization competence. *Journal Reproduction and Development*, v.50, n. 5, p. 541-547, 2004.
- SIRARD, M. A; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, v. 65, p.126-136, 2006.
- UEDA, S.; MASUTANI, H.; NAKAMURA, H.; TANAKA, T.; UENO, M.; YODOI, J. Redox control of cell death. *Antioxidants e Redox Signaling*, v. 4, n. 3, p. 405-414, 2002.
- WATSON, A.J.; DE SOUSA, P.; CAVENEY, A.; BARCROFT, L.C.; NATALE, D.; URQUHART, J.; ZUELKE, K.A.; JONES, D.P.; PERREAULTS, S.D. Glutathione oxidation is associated with altered microtubule function and disrupted fertilization in mature hamster oocytes. *Biology of Reproduction*, v. 57, p. 1413-1419, 1997.