

PROTÓCOLOS DE AVALIAÇÃO DE MATURAÇÃO *IN VITRO* E VIABILIDADE CELULAR DE OÓCITOS BOVINOS

LEÃO, Delva Pereira¹; LUCAS, Caroline¹; LEON, Priscila Marques¹; CAMPOS, Vinícius Farias¹; COLLARES, Tiago¹

¹Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese Animal, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas

leaodel@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

A maturação *in vitro* (MIV) é o processo caracterizado por transformações celulares e moleculares do complexo *cumulus*-oócito (CCO) que se inicia no momento da coleta do oócito. Com a quebra da vesícula germinativa, ocorre a retomada da capacidade de realização de meiose, iniciando a maturação oocitária (Leivas *et al.*, 2004).

O processo de maturação pode ser dividido em crescimento oocitário, capacitação, maturação e ativação do oócito. Na fase de crescimento ocorre aumento de tamanho do oócito e organelas, bem como organização através da síntese de RNA e proteínas. A capacitação oocitária ocorre no folículo antral e finaliza a síntese de RNA, mantendo ainda o primeiro bloqueio meiótico. A maturação oocitária abrange a maturação nuclear e citoplasmática. No núcleo ocorre a reversão do primeiro bloqueio meiótico e extrusão do 1º corpúsculo polar, com parada na metáfase II caracterizando o segundo bloqueio meiótico (Gottardi *et al.*, 2009). No citoplasma, as mitocôndrias e complexo de Golgi se redistribuem ocupando o centro da célula, os grânulos corticais migram para a periferia se aproximando da membrana, os microtúbulos e microfilamentos são reorganizados e através da modificação das junções *gap* as células do *cumulus* se expandem. Após essas transformações, o oócito está em metáfase II e pronto para ser ativado pela fecundação de um espermatozoide (Marei *et al.*, 2010).

Os eventos que ocorrem durante a MIV são essenciais para gerar um oócito competente a ser submetido à fecundação *in vitro* (FIV), e para produzir embriões que sejam viáveis para produção e cultivo *in vitro* (Marei *et al.*, 2010). A MIV é a etapa inicial e determinante na aplicação de biotécnicas reprodutivas, de forma que se esse processo não é bem padronizado e controlado torna-se muito difícil obter oócitos viáveis, que são essenciais para a reprodução animal na biotecnologia e outras áreas.

Dada a importância da MIV o presente trabalho objetivou avaliar os protocolos de coloração de oócitos através de fluorocromos, buscando padronizá-los para avaliação da eficiência da MIV durante a manipulação de oócitos bovinos.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Abatedouros locais forneceram ovários bovinos que foram transportados em recipiente térmico até o Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da UFPel. Os ovários foram lavados em solução salina 0,9% e em seguida colocados em um béquer em banho-maria com temperatura controlada de 35°C. Os complexos *cumulus* oócitos (CCO) foram obtidos pela técnica de aspiração folicular. Com o auxílio de seringa de 20mL e agulha 40 x 12mm o conteúdo folicular foi aspirado de folículos com 2-8 mm de diâmetro e então dispensado em tubo falcon de 50mL, mantido em banho seco com temperatura controlada. O líquido folicular foi filtrado e lavado com PBS (*phosphate buffer saline*) em filtro coletor de embriões (Nutricell, Campinas-SP), o depósito celular filtrado foi colocado em placa de petri para seleção dos CCO em lupa estereomicroscópica.

Os oócitos foram avaliados visualmente quanto ao número de camadas e grau de compactação das células do *cumulus*, homogeneidade do citoplasma e integridade da zona pelúcida (Gottardi *et al.*, 2009).

Com o total de oócitos selecionados, os grupos foram formados, cultivados em meio TCM modificado e dispostos em gotas de 60 a 120 µL, submersas em óleo mineral. As placas de petri contendo as gotas foram mantidas em estufa a 38,5°C com 5% de CO₂, durante 22 a 24 h. Ao fim do tempo de maturação, todos os oócitos foram submetidos à coloração de Hoechst 33342 (Sigma), usado para avaliar maturação nuclear. Subsequentemente foram divididos em dois grupos e submetidos à coloração Live/Dead Viability/Citotoxicity kit (Invitrogen), usado para avaliar viabilidade celular; e ROS (diacetato de 2',7' diclorofluoresceína) (Sigma) para avaliar produção de espécies reativas de oxigênio em oócitos bovinos. Ao fim de cada coloração os oócitos foram classificados de acordo com a observação no microscópio de epifluorescência Olympus BX51 em diferentes filtros.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os oócitos corados com Hoescht 33342(n=240) foram classificados em maduros, imaturos e degenerados, conforme observado na tabela 1. A classificação ocorreu através da identificação da extrusão do 1º corpúsculo polar, indicativo de maturação oocitária.

A coloração de Live/Dead foi realizada com 122 oócitos (n=122). Os oócitos foram classificados em viáveis e inviáveis através da observação do princípio da coloração, em filtro de 450 nm. As células coradas em verde indicam membrana celular íntegra e acumulam diacetato de fluoresceína no citoplasma. As coradas em vermelho indicam membrana lesada através da penetração do corante iodeto de propídeo na célula (Tab. 1). Um total de 113 oócitos foi utilizado na coloração de ROS. A análise foi realizada através da medição visual da intensidade de fluorescência (Fig. 1).

Tabela 1. Resultado das colorações Hoescht e Live/Dead, com classificação previamente descrita.

Teste de Coloração		CCO (%)
Hoescht	Imaturos	145 (60,41)
	Maturos	64 (26,66)
	Degenerados	31 (12,91)
	Subtotal	240
Live/Dead	Viáveis	93 (76,23)
	Inviáveis	29 (23,77)
	Subtotal	122

Figura 1. Resultado da coloração de ROS. A seta vermelha indica o oócito com maior produção de ROS e a seta azul os oócitos com menor produção.

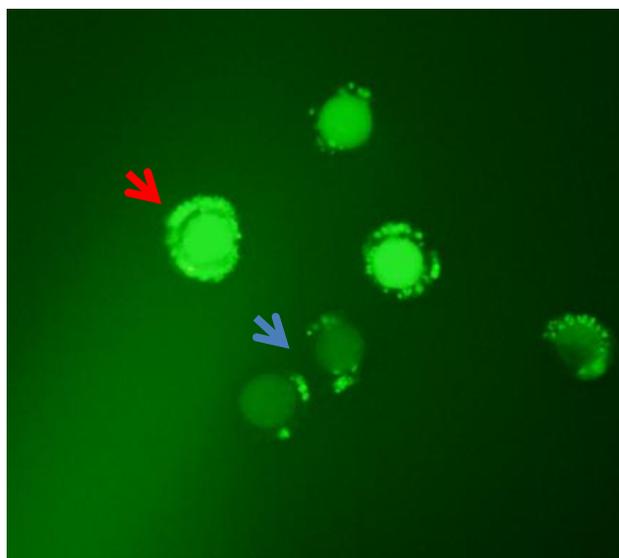
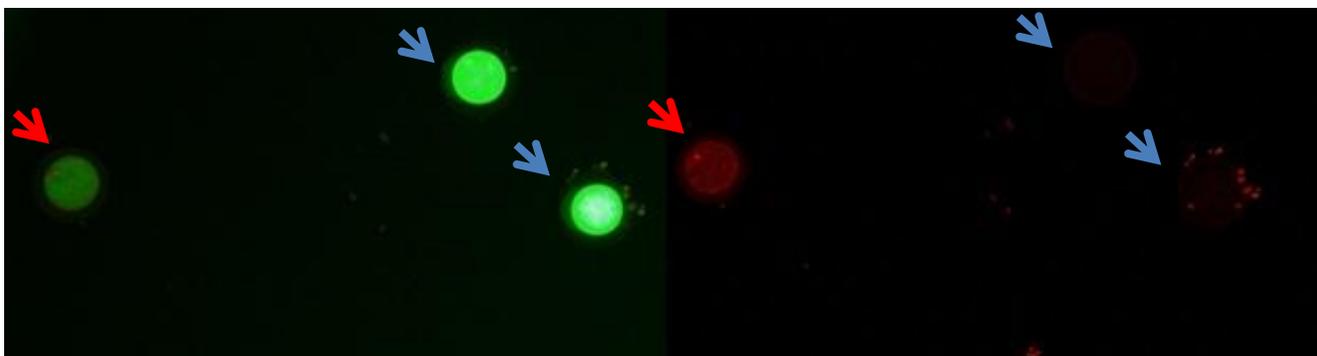


Figura 2. Resultado da coloração Live/Dead. Comparativo entre observação em filtro verde e vermelho de 450 nm, a seta vermelha indica o oócito inviável e a seta azul os oócitos viáveis.



A utilização em conjunto destas três técnicas se mostrou fundamental para avaliar aspectos técnicos da MIV de CCO bovino, promovendo maior controle e monitoramento do processo de maturação. Os resultados obtidos neste

experimento foram semelhantes com os presentes na bibliografia. Protocolos de coloração são essenciais na rotina em um laboratório de embriologia, tendo em vista que a MIV é essencial para aplicação das biotécnicas subsequentes a esta, como FIV, produção *in vitro* (PIV) e cultivo *in vitro* (CIV) de embriões.

4 CONCLUSÃO

As três colorações testadas são essenciais para verificar se o CCO atingiu nível de maturação e expansão desejados, o que vai refletir na sua competência para FIV e posterior taxa de clivagem, durante o desenvolvimento embrionário (Leivas *et. al.*, 2004). As colorações aqui testadas podem ser implementadas como rotina em laboratórios de embriologia, pois não apresentam custo elevado e revelam resultados satisfatórios.

5 REFERÊNCIAS

MAREI, WF; WATHES, DC; FOULADI-NASHTA, AA. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. **Reproduction**, v. 6, p. 979-88, 2010.

SOMFAI, T; OZAWA, M; NOGUCHI, J. Developmental competence of in vitro fertilized porcine oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. **Cryobiology**, v. 55, p. 115-26, 2007.

MORADO, SA; CETICA, PD; BECONI, MT; DALVIT, GC. Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, 2009, 21, 608–614

GOTTARDI, FP; MINGOTI, GZ. Bovine oocyte maturation and influence on subsequent embryonic developmental competence. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.33, n.2, p.82-94, abr./jun. 2009.

LEIVAS, FG; BRUM, DS; MEZZALIRA, A. Transport of bovine oocytes in maturation medium without a controlled gaseous atmosphere. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p.219-224, jan-fev, 2004.

CARMINATI, PO. Respostas celulares aos danos causados pelo antitumoral cisplatina em linhagens de fibroblastos humanos normais (MRC-5) e astrocística (U343 MG-a). 2005. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, São Paulo, 2005.