UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Instituto de Biologia

Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado

Trabalho de Conclusão de Curso

Butafosfan e Paraoxanase-1 na maturação *in vitro* de oócitos bovinos e seus efeitos sobre a expressão de genes ligados ao estresse oxidativo na fase embrionária inicial

Thaís Casarin da Silva

Pelotas, 2015

Thaís Casarin da Silva

Butafosfan e Paraoxanase-1 na maturação *in vitro* de oócitos bovinos e seus efeitos sobre a expressão de genes ligados ao estresse oxidativo na fase embrionária inicial

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Viviane Rohrig Rabassa

Coorientadora: Eugenia Jacira Bolacel

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S586b Silva, Thaís Casarin da

Butafosfan e paraoxanase-1 na maturação in vitro de oócitos bovinos e seus efeitos sobre a expressão de genes ligados ao estresse oxidativo na fase embrionária inicial / Thaís Casarin da Silva ; Viviane Rohrig Rabassa, orientadora ; Eugenia Jacira Bolacel, coorientador. — Pelotas, 2015.

40 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) — Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Desenvolvimento embrionário. 2. Mnsod. 3. Bax. 4. Bcl2. I. Rabassa, Viviane Rohrig, orient. II. Bolacel, Eugenia Jacira, coorient. III. Título.

CDD : 574.33

Elaborada por Maria Beatriz Vaghetti Vieira CRB: 10/1032

Thaís Casarin da Silva

Butafosfan e Paraoxanase-1 na maturação *in vitro* de oócitos bovinos e seus efeitos sobre a expressão de genes ligados ao estresse oxidativo na fase embrionária inicial

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas no Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 19 de novembro de 2015.

Banca Examinadora:

Dr. M.V. Viviane Rohrig Rabassa. Doutora em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas (Orientadora).

MSc. M.V. Lucas Teixeira Hax. Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

MSc. Zoot. Joao Alveiro Alvarado Rincon. Mestre em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas.

MSc M.V. Diego Andres Velasco Acosta. Mestre em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas.

Dedico este trabalho à Deus e aos meus pais, Almiro e Cléia, pois sem eles este trabalho e muitos dos meus sonhos não se realizariam.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por tornar tudo isso possível, por estar sempre comigo, me guiando, abençoando, iluminando as minhas escolhas, criando oportunidades e me fortalecendo para seguir em frente sempre.

Aos meus pais, Almiro Luis Carvalho da Silva e Cléia Elizabete Casarin da Silva, por todo amor, companheirismo, dedicação, incentivo e apoio incondicional. Os quais, nunca mediram esforços para que eu alcançasse a minha felicidade e sucesso. Vocês são a minha base, meu porto seguro, devo tudo a vocês.

Ao meu irmão Gustavo Casarin da Silva e ao Bruno Chaves Novack, que estiveram sempre comigo, me aturando, dando força, conselhos, apoiando as minhas decisões e me fazendo rir até mesmo nos momentos de aflição ou estresse.

Ao Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), pelas diversas e grandes oportunidades, possibilitando crescimento pessoal e profissional e pelas grandes amizades formadas.

A toda minha família, amigos e colegas que de alguma forma participaram da minha formação, acreditando, apoiando e ajudando até mesmo nas coletas de insetos e plantas, tanto para a caixa entomológica, quanto para os herbários.

Enfim, Muito Obrigada!

Resumo

DA SILVA, Thaís Casarin. **Butafosfan e Paraoxanase-1 na maturação *in vitro* de oócitos bovinos e seus efeitos sobre a expressão de genes ligados ao estresse oxidativo na fase embrionária inicial.** 2015. 42.f. Trabalho de Conclusão de Curso, Graduação em Ciências Biológicas. Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Para melhorar a eficiência da produção de embriões bovinos *in vitro*, diversas estratégias estão sendo testadas. A adição de minerais, como o Butafosfan, que é uma fonte de fósforo orgânico, pode enriquecer o meio de maturação oocitária. Assim como, a adição de substâncias antioxidantes, como a Paraoxanase-1, uma enzima com efeito antioxidante em membranas celulares, pode contribuir para o desenvolvimento *in vitro*. O objetivo deste estudo foi determinar o efeito do Butafosfan e da Paraoxanase-1 durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos, através da expressão de genes ligados ao estresse oxidativo e à apoptose. Foi realizada aspiração folicular de ovários provenientes de abatedouro local para a obtenção dos oócitos. No experimento com Butafosfan, os oócitos foram divididos em 4 tratamentos, recebendo doses crescentes de Butafosfan (T_0=0,0 mg/L, T_1=50mg/L, T_2=100mg/L e T_3=200mg/L de meio de maturação), contendo 25 oócitos por tratamento. No experimento com paraoxanase-1, os oócitos foram divididos em 4 grupos contendo 50 oócitos cada, cujo meio de maturação *in vitro* foi suplementado com doses crescentes de Paraoxanase-1 recombinante humana (T_0=0,0, T_1=0,02, T_2=0,04 e T_3=0,08 mg/mL). A metodologia da rotina para produção *in vitro* foi igual nos dois experimentos. A incubação dos oócitos com os espermatozoides foi de 22-24h à 39°C em estufa com 5% de CO_2, sendo considerado como o dia 0. Os prováveis zigotos foram submetidos ao desnudamento e retirada de espermatozoides através de lavagem em meio *in vitro* de transporte e meio de cultivo. Os zigotos permaneceram em estufa à 39°C, acondicionados em *bags* com 5% CO_2, 5% O_2 e 90% N_2, durante 7 dias. Após 48h da fecundação foi realizada a avaliação da clivagem. As avaliações do desenvolvimento embrionário foram realizadas no D7 de cultivo. O RNA foi isolado e a expressão gênica dos genes BAX, BCL2 e MnSOD, foi avaliada mediante a técnica de PCR quantitativa em tempo real. A análise estatística foi através do procedimento GLM usando o programa SAS (SAS, Cary, NC, EUA). A produção de embriões foi 34,7%(T_0), 28,5%(T_1), 33,5%(T_2) e 31,6%(T_3) paras os tratamentos com Butafosfan, não apresentando diferença significativa (P>0,05). A adição de Paraoxanase-1, não apresentou diferença significativa nas taxas de clivagem, porém foi observado efeito linear positivo na produção embrionária (22,1%; 29,2%; 31,7% e 33,8%) a medida que as doses foram aumentadas (P>0,0001). A expressão dos genes BAX, BCL-2 e MnSOD nos embriões não foi afetada. Porém, mais estudos são necessários para melhor elucidar os efeitos do Butafosfan e Paraoxanase-1 durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

Palavras-chave: desenvolvimento embrionário; BAX; BCL2; MnSOD

Abstract

DA SILVA, Thaís Casarin. **Butafosfan and Paraoxanase-1 *in vitro* maturation of bovine oocytes and the effects on the expression of genes related to oxidative stress in preimplantation embrios.** 2015. 42f. Work of course completion, Graduation in Biological Sciences. Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

To improve the efficiency of *in vitro* bovine embryos production, several strategies have being tested. The addition of minerals, such as Butafosfan, which is an organic source of phosphorus, can improve the oocyte maturation medium. Also, the addition of antioxidants, such Paraoxanase-1, an enzyme that has antioxidant effect on cell membranes, might contribute to *in vitro* development. This study aim to determine the effect of Butafosfan and Paraoxanase-1, during *in vitro* maturation of bovine oocytes, on expression of genes related to oxidative stress and apoptosis. Follicular aspirations of ovaries, from a local slaughterhouse, were performed to obtain the oocytes. In the experiment with Butafosfan, the oocytes were divided into 4 treatments, receiving increasing doses of Butafosfan (T_0=0,0 mg/L, T_1=50mg/L, T_2= 100mg/L e T_3=200mg/L by liter of maturation medium), containing 25 oocytes by treatment. In the experiment with Paraoxanase-1, the oocytes were divided into 4 groups, containing 50 oocytes by group, with increasing doses of paraoxanase-1 in the maturation medium (T_0=0,0, T_1=0,02, T_2=0,04 e T_3=0,08 mg/mL). The *in vitro* production routine methodology was similar in both experiments. The incubation of oocytes with spermatozoids occurred during 22-24h at 39°C in an incubator with 5% CO_2, being considered as day 0. The possible zygotes were submitted to denudation and removal of spermatozoids by washing in medium *in vitro* of transport and culture medium. The zygotes remained in the incubator at 39 °C, conditioned in bags with 5% CO_2 + 5% O_2 + 90% N_2, during 7 days. After 48h of fertilization, was performed the evaluation of the cleavage. The evaluations of embryonic development were realized in D7 of development. The RNA was isolated and gene expression of BAX, BCL2 e MnSOD were evaluated by the Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR. Statistical analysis was performed through the GLM proceedings using the SAS program (SAS, Cary, NC, EUA). The embryo production was 34,7% (T_0), 28,5% (T_1), 33,5% (T_2) and 31,6% (T_3) for treatments with Butafosfan, were not different between treatments (P>0,05). The addition of Paraoxanase-1, did not affect the cleavage rates, however, a linear improvement in embryo production was observed (22,1%; 29,2%; 31,7% e 33,8) (P<0,05) when the doses were increased. The mRNA expression of BAX, BCL-2 e MnSOD was not affected by treatments. Nevertheless, more studies are necessary to better elucidate the effects of Butafosfan and Paraoxanase-1 addition in the in vitro embryo production.

Key words: development embryonic; BAX; BCL2; MnSOD

Lista de Figuras

Figura 1 Aspiração folicular de ovário bovino através da utilização de uma bomba de vácuo..... 22

Figura 2 Placa com zigotos bovinos acondicionados em bags com 5% CO_2 + 5% O_2 + 90% N_2, durante 7 dias..... 23

Figura 3 *Loading buffer* (3,0µl) pipetado em parafilme..... 25

Figura 4 *Loading buffer* e amostras nos poços do gel de agarose, na cuba de eletroforese..... 26

Figura 5 Produção de embriões bovinos em D7 de acordo com a adição de doses crescentes de rPON1 durante a maturação oocitária *in vitro*..... 30

Lista de Tabelas

Tabela 1 Sequência específica de *primers* utilizados para Real Time PCR (GYU-JIN et al, 2007), para os genes BCL2, BAX, MnSOD e H2A..... 28

Tabela 2 Taxa de clivagem e percentual de embriões bovinos em D7 de cultivo, de acordo com a adição de Butafosfan no meio MIV (P<0,05)..... 29

Tabela 3 Expressão relativa dos genes BAX, BCL-2 e MnSOD nos embriões, após adição de rPON1 no meio MIV..... 31

Lista de abreviaturas e siglas

AGNE	Ácidos graxos não esterificados
Bcl2	Proteína: *B cell leukemia/lymphoma protein 2*
BCL2	Gene: *B cell leukemia/lymphoma protein 2*
BAX	*Bcl-2 associated protein X*
BHB	β-hidroxibutirato
BI	Blastocisto inicial
BL	Blastocisto
BX	Blastocisto expandido
BN	Blastocisto eclodindo
BE	Blastocisto eclodido
CO_2	Dióxido de carbono
ºC	Graus Celsius
CIV	Cultivo *in vitro*
cDNA	DNA complementar
DNAse	Desoxirribonuclease
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
D0	Dia 0 do cultivo/ dia da inseminação
D7	Sétimo dia de cultivo
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FIV	Fecundação *in vitro*
For	*Forward*
H2A	Histona H2A
Mm	Milímetro
mL	Mililitro
µL	Microlitro
Mg	Microgramo
MIV	Maturação *in vitro*

MIV-T	Meio *in vitro* de transporte
MnSOD	Superóxido dismutase dependente de manganês
MC	Mórula compacta
Mg	Miligrama
NaCl	Cloreto de sódio
nM	Nanomolar
PHE	Penicilamina-hipotaurina-epinefrina
PIV	Produção *in vitro*
Pi	Íons de fosfato
PIVE	Produção *in vitro* de embriões
PON1	Paraoxanase-1
rPON1	Paraoxanase-1 recombinante humana
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
RS	Rio Grande do Sul
RT	Transcrição reversa
Rev	*Reverse*
Tº	Temperatura
TBE	Solução tampão eletrolítico
U	Unidade
V	Volts

Sumário

1 Introdução..... 13

1.1 Objetivos..... 16

1.1.1 Objetivo Geral..... 16

1.1.2 Objetivos Específicos..... 16

2 Revisão de Literatura..... 17

2.1 Produção in vitro de Embriões..... 17

2.2 Butafosfan..... 18

2.3 Paraoxanase-1..... 19

3 Material e Métodos..... 21

3.1 Obtenção e maturação de oócitos bovinos *in vitro*..... 21

3.2 Fecundação in vitro..... 23

3.3 Cultivo e avaliação embrionária..... 23

3.4 Extração de RNA total..... 24

3.5 Confirmação da integridade do RNA total..... 25

3.6 Síntese de cDNA..... 27

3.7 Expressão gênica..... 27

4 Resultados e Discussão..... 29

5 Considerações Finais..... 32

6 Perspectivas Futuras..... 33

Referências..... 34

1 Introdução

O melhoramento genético tem sido um importante foco de estudo como estratégia para maximizar a eficiência produtiva dos rebanhos. Neste sentido, torna-se indispensável a utilização e desenvolvimento de biotecnologias que permitam o aumento da eficiência reprodutiva. Umas das alternativas para atingir esse objetivo é a produção *in vitro* (PIV) e *in vivo* de embriões, onde o Brasil se encontra entre os maiores produtores de embriões do mundo (PARRA, 2008).

O gado indiano (*Bos taurus indicus*) possui maior resistência a temperaturas elevadas, umidade, parasitas e ainda, possui maior eficiência na produção *in vitro* e *in vivo* de embriões do que o gado europeu (*Bos taurus taurus*) (NABHAN, 2011). No Rio Grande do Sul, os rebanhos bovinos são constituídos principalmente por gado europeu, sendo que o estado é o sexto maior produtor de gado do Brasil. Desta maneira, a melhora da eficiência reprodutiva destes animais é essencial, demostrando a grande importância de estudos na área visando o melhoramento das técnicas reprodutivas (SEPLAG, 2014).

Segundo Mota (2012), a produção *in vivo* de embriões possui maior eficiência na maturação dos oócitos, não sendo necessário controlar variáveis, como temperatura e oxigênio, além de produzir embriões com maior qualidade e viabilidade. Porém, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) permite a intensificação reprodutiva de animais com alto valor genético, possibilitando aumentar a taxa de natalidade através de uma única fêmea e um macho para produção de vários embriões, que mais tarde poderão ser transferidos a vacas de baixo valor genético, ou seja, uma única fêmea pode produzir, 36 crias ao ano (RUMPF, 2007).

Para a PIVE, devem ocorrer três principais processos: maturação (MIV), fecundação (FIV) e cultivo (CIV). Em bovinos, a MIV ocorre durante 18 à 24h, período no qual o oócito progride da primeira prófase meiótica até a fase de metáfase II. Na FIV ocorre a fecundação do ovócito, processo que dura cerca de 18 à 24h, a partir da previa avaliação de vigor, motilidade e ajuste na concentração de espermatozoides. Posteriormente, os prováveis zigotos são levados a CIV por aproximadamente sete dias, para que ocorra o desenvolvimento do ovócito fertilizado até o estádio de blastocisto. Durante este período ocorrem diversos eventos de extrema importância, como ativação do genoma embrionário, divisão celular, compactação dos blastômeros no estádio de mórula e início da diferenciação embrionária com a formação da blastocele (GONÇALVES, 2007; BUENO, 2008).

A maturação é um dos mais importantes processos da PIVE, por ser o período no qual o oócito adquire capacidade para prosseguir nos próximos processos de FIV e CIV. Durante a maturação ocorrem diversas alterações nucleares e citoplasmáticas, como condensação da cromatina, extrusão do primeiro corpúsculo polar, formação do segundo fuso meiótico, síntese de proteínas e diversas atividades bioquímicas que ocorrem através de cascatas de fosforilação e desfosforilação de proteínas envolvidas na regulação meiótica, as quais dependem da disponibilidade de fósforo (MEINECKE et al, 2001; DE SOUSA et al, 2004). Durante esses processos, o consumo de oxigênio decorrente do metabolismo oocitário produz espécies reativas de oxigênio (EROs) (AGARWAL et al, 2005).

A geração excessiva de EROs e/ou a diminuição de antioxidantes causa estresse oxidativo, podendo diminuir a eficiência da maturação oocitária (WANG, et al, 2002; AGARWAL et al, 2005), prejudicando o processo de aquisição de competência oocitária (CARREL et al, 2005). A deterioração oxidativa dos ácidos graxos poli-insaturados, chamada de peroxidação lipídica, acarreta em injúrias celulares irreversíveis (LIMA; ABDALLA, 2001). Em função da grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados, a membrana celular é a organela mais afetada pelo estresse oxidativo. Consequentemente, ocorre perda da permeabilidade e seletividade da membrana, formação de produtos citotóxicos dentre outros efeitos prejudiciais à saúde da célula que a levam a apoptose (MELLO et al, 1983; HERSHKO, 1989; WANG et al, 2002).

Visando estas problemáticas, apesar de ter ocorrido avanços das técnicas nas últimas três décadas, apenas 30 a 40% dos oócitos bovinos suportam o

desenvolvimento até a fase de blastocisto. Com isso, são necessários mais estudos, para aumentar a eficiência e desenvolvimento de novas técnicas ou aprimorar as já existentes, na PIVE (LONERGAN, 2014).

Atualmente muitos trabalhos estudam a utilização de diversas substâncias para enriquecer o meio de cultura dos oócitos, desta maneira, surge a possibilidade da utilização do fármaco Butafosfan, que é uma fonte orgânica de fósforo, o qual possui melhor biodisponibilidade em comparação com o fósforo inorgânico. Sendo assim, é responsável pelo fornecimento de íons de fosfato (Pi), essenciais para a catalise de várias reações celulares, como a fosforilação e síntese de ATP (DENIZ, 2008; MACIEL et al, 2010; SCHNEIDER et al, 2013; PEREIRA et al, 2013a; LUCAS, 2014). Além disso, alguns autores sugerem que o fósforo pode aumentar a atividade de diversas enzimas antioxidantes, importantes para a homeostase celular e previne a oxidação dos lipídeos presentes no organismo (PENINO et al, 2013).

Deste modo, a utilização de Butafosfan poderia enriquecer o meio de MIV, melhorando a qualidade de maturação do oócito, que está relacionada diretamente com a taxa de apoptose no embrião, o qual é dependente do tipo e quantidade de estoque materno de RNAm e proteínas armazenadas durante a maturação citoplasmática (MESQUITA, 2005).

Outra alternativa para melhora do processo de MIV é a utilização da Paraoxonase-1 (PON1), uma enzima de origem hepática, definida como uma esterase cálcio-dependente, que apresenta capacidade antioxidante em membranas celulares. A PON1 é capaz de reduzir as EROs e hidrolisar peróxidos lipídicos (DRAGANOV et al, 2000, 2004).

Existem algumas proteínas que estão associadas à regulação do processo apoptótico, como é o caso da família da *B cell leukemia/lymphoma protein 2* (bcl-2), que pode estar presente no citosol ou em algumas das organelas celulares. Neste contexto, diversos genes estão envolvidos, podendo ser pró-apoptóticos, como o *Bcl-2 associated protein X* (BAX) ou anti-apoptóticos, como o *B cell leukemia/lymphoma protein 2* (BCL-2) (MESQUITA, 2005). Estudos indicam que a relação de BCL2/BAX pode determinar se a célula irá sofrer apoptose ou não. Além disso, oócitos de boa qualidade possuem maior concentração de proteína BCL-2 do que proteína BAX (YANG; RAJAMAHENDRAN, 2002; DE BEM et al, 2014).

A Superóxido Dismutase dependente de Manganês (MnSOD) é a proteína que corresponde ao gene que desempenha um papel na proteção das células contra o estresse oxidativo, sendo importante na defesa antioxidante, protegendo os componentes mitocondriais de superoxidação no sistema intracelular (KIM et al, 2012).

Portanto, a utilização do Butafosfan ou PON1 durante a MIV aumenta a viabilidade e qualidade dos embriões, principalmente pela possibilidade de promover uma melhor maturação oocitária através da suplementação de fósforo ou redução do estresse oxidativo e com isso, ter potencial de diminuir a taxa de apoptose. Há diversas formas de analisar os efeitos da suplementação no meio de cultivo, uma delas é através da expressão gênica, que avalia e compara os produtos sintetizados por cada gene (GYU-JIN et al, 2007).

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Determinar o efeito do Butafosfan e da PON 1 durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre o desenvolvimento embrionário inicial, através da expressão de genes ligados ao estresse oxidativo e à apoptose.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de Butafosfan e PON1 durante a maturação oocitária sobre o desenvolvimento embrionário inicial;
- Avaliar a expressão dos genes BAX, BCL2 e MnSOD em embriões bovinos, conforme a adição de Butafosfan e PON1 na maturação oocitária *in vitro*;
- Relacionar o efeito da PON1 com o estresse oxidativo sobre o desenvolvimento embrionário inicial.

2 Revisão de Literatura

2.1 Produção de embriões *in vitro*

A técnica de PIVE se expandiu a partir de 1982, quando nasceu o primeiro bezerro através da FIV nos Estados Unidos (BRACKETT et al, 1982). E com o trabalho de Fukuda et al (1990), houve nascimento dos primeiros terneiros produtos dos processos de FIV, MIV e CIV. Desde então, esta técnica vem se estabelecendo, sendo amplamente utilizada em diferentes estudos, relacionados com à biotecnologia da reprodução, tanto em animais como em humanos. Em bovinos, é muito utilizada para buscar o melhoramento genético (ANDREOTI, 2007) e está sendo incorporada lentamente nos protocolos de produção (RUMPF, 2007).

Apesar disso, a PIVE ainda é ineficiente em comparação a produção *in vivo* (MOTA et al. 2012). Em bovinos, apenas 80% dos oócitos são fecundados, dos quais 30 a 40% chegam a fase de blastocisto no cultivo (LONERGAN et al. 2014).

Atualmente a PIVE é realizada através de três etapas: maturação, fecundação e cultivo, sendo a maturação um processo essencial, pois é neste período que o oócito adquire capacidade para se desenvolver até o estágio de blastocisto e posteriormente, ser capaz de induzir uma gestação (CARREL et al, 2005; FARIN et al, 2007). Sendo assim, decorre a necessidade de se avaliar a qualidade do meio de MIV, pois é uma das etapas determinantes para o sucesso da técnica de PIVE (PINTO, 2012).

Desta forma, diversos estudos como os de Schneider et al (2013), Pinto (2012) e Lucas (2014), buscam alternativas para melhorar a eficiência da PIVE, como a utilização de substâncias, entre elas fármacos, hormônios e antioxidantes que estão sendo testados experimentalmente para enriquecer as culturas tanto de

oócitos, quanto de possíveis embriões. Neste contexto, encontra-se a Tretinoina, PON1, prostaglandina, fator de crescimento fibroblástico, entre outras.

2.2 Butafosfan

O Butafosfan juntamente com a cianocobalamina (Catosal®, solução injetável, Bayer) vem sendo estudado a mais de 50 anos em vários países do mundo, para prevenção ou tratamento de problemas metabólicos ou reprodutivos em bovinos (DENIZ, 2009). Atualmente, o Butafosfan tem sido usado como ferramenta de modulação metabólica em bovinos leiteiros no pós-parto (PEREIRA et al, 2013a) e no trabalho de Rollin et al (2010) aplicou-se uma dose de 25mL de 10% de Butafosfan e cianocobalamina (Catosal®, Bayer, Shawnee Mission, KS) antes do parto e outra dose após o parto, em vacas de diversos grupos etários, porém, entre os grupos tratamento e controle, não apresentaram diferenças significativas em relação as concentrações de fósforo e nem de β-hidroxibutirato (BHB), embora houvesse um aumento nas concentrações médias de BHB nos dois grupos entre as primeira e segunda mensuração.

Por outro lado, o estudo de Pereira et al (2013a), indicou aumento da produção de leite e redução das concentrações de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e BHB em vacas da raça Holandês, após aplicações de Butafosfan no período pós-parto, melhorando também a função imunológica e consequentemente diminuído a ocorrência de doenças nestes animais. Em outro trabalho de Pereira et al (2013b), foi aplicado 1000mg de Butafosfan e 0,5mg de cianocobalamina em ovelhas no pós-parto, que apresentaram menores concentrações séricas de AGNE e de acetona, além de apresentarem maiores concentrações de glicose, fósforo e consumo de matéria seca no período pós-parto, consequentemente apresentando uma melhora no status energético.

Segundo o estudo de Turk (2013), o aumento dos níveis de AGNE podem aumentar os níveis BHB, o que também pode estar relacionado com elevação da geração de EROs na mitocôndria (PEDERNERA et al., 2009). Com isso, entende-se que a diminuição dos níveis de AGNE e BHB pode prevenir o estresse oxidativo celular nos animais tratados com Butafosfan e cianocobalamina (GUIMARÃES, et al. 2013).

O trabalho de Lima (2014) avaliou o efeito do Butafosfan e cianocobalamina em vacas da raça Jersey sobre a recuperação de oócitos *in vivo* e na PIVE. As vacas que receberam 4500mg de Butafosfan e 2,25mg de cianocobalamina, tiveram uma tendência (P=0.08) de redução do colesterol sérico, uma maior (P=0.02) média de embriões produzidos na aspiração folicular e aumento (P=0.07) na produção de oócitos grau II. Além disso, o Butafosfan e a cianocobalamina também foram utilizados para melhoramento de sêmen fresco e refrigerado de garanhões (PENINO et al, 2013).

Apesar dos esforços de diversos autores, o mecanismo de ação da molécula de Butafosfan em nível celular e molecular ainda precisa ser melhor elucidado. Alguns estudos sugerem que o fósforo aumenta a atividade de várias enzimas antioxidantes no metabolismo celular e atua na replicação celular, podendo aportar alguns dos cofatores necessários na replicação do DNA, além de ter um importante papel na manutenção da estabilidade genética e na sinalização hormonal (PENINO et al, 2013).

2.3 Paraoxanase-1

A PON1, uma enzima produzida no fígado e que se apresenta ligada exclusivamente à lipoproteína de alta densidade (HDL) (GRAGONOV et al, 2000), possui atividade anti-inflamatória e anti-atrogênica juntamente ao HDL. A PON1 protege as células, os lipídeos, o HDL e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) dos malefícios oxidativos e peroxidativos (DRAGONOV et al, 2000; 2004).

Em bovinos, esta enzima é caracterizada como uma proteína de fase aguda negativa, por reduzir seus níveis séricos em resposta à citosina liberada durante a inflamação (BIONAZ et al, 2007), podendo ser utilizada para detectar doenças precoces no pré-parto (SCHNEIDER; CORREA e BUTLER, 2013). Já em humanos, PON1 esta sendo associada a diversas doenças que afetam diferentes órgãos, como o envelhecimento e doenças dos sistemas cardiovascular, endócrino, nervoso e gastrointestinal (PEZZULO et al, 2012). Além disso, sabe-se que a atividade sérica de PON1 pode ser influenciada por diversos parâmetros, tais como fatores genéticos, nutricionais, estilo de vida, idade, estado de saúde, uso de fármacos e estresse oxidativo (SCHRADER; RIMBACH, 2011).

Essa enzima é capaz de hidrolizar peróxidos lipídicos e prevenir o aumento das EROs (DURRINGTON et al, 2001). Em função da permeabilidade da membrana basal do folículo ovariano, a única lipoproteína presente no líquido folicular é o HDL (JASPARD et al, 1996). Como a PON1 encontra-se conjugada ao HDL, a mesma é transferida do soro para dentro do folículo juntamente com à lipoproteína (SCHNEIDER et al, 2013).

A atividade de PON1 no fluído folicular varia de acordo com a atividade do folículo. Folículos estrogênio ativos apresentaram 82,6 U/mL enquanto folículos atrésicos apresentaram 53,9 U/mL de PON1 (SCHNEIDER et al, 2013). A maior atividade intra-folicular e sérica de PON1 foi associada a melhor qualidade embrionária e aumento no número de blastômeros em mulheres submetidas à FIV (BROWNE et. al, 2008). Esses resultados indicam que a PON1 pode conferir proteção ao oócito, possibilitando um melhor desenvolvimento do embrião nos estádios iniciais (FUJIMOTO et al, 2010).

Existem diversas formas de analisar os efeitos da suplementação no meio de cultivo, uma destas formas é através da expressão gênica, que avalia e compara os produtos sintetizados por cada gene (GYU-JIN et al, 2007). Em relação à qualidade oocitária, alguns autores indicam que a expressão de genes pontuais pode ser utilizada como indicador de qualidade embrionária (LAZARRI, 2011). Neste contexto, no trabalho de Kim (2012) observou-se que os genes BAX e BCL2 indicaram a melhora ou piora do desenvolvimento celular e o gene MnSOD foi utilizado como indicador da atividade mitocondrial, relacionado à desintoxicação de espécies reativas de oxigênio, à diferenciação celular e à compactação do embrião.

Sabendo que o Butafosfan é uma fonte de fósforo orgânico, o qual é essencial para a fosforilação e síntese de ATP (DENIZ, 2008; MACIEL et al, 2010; SCHNEIDER et al, 2013; PEREIRA et al, 2013a; PENINO, et al. 2013; LUCAS, 2014) e além disso, que PON1 possui ação antioxidante em membranas celulares, sendo capaz de reduzir as EROs e hidrolisar peróxidos lipídicos (DRAGANOV et al, 2000, 2004) entende-se que os mesmos, podem aperfeiçoar a técnica de PIVE.

3 Material e Métodos

3.1 Obtenção e maturação de oócitos bovinos *in vitro*

O experimento foi realizado em três locais, sendo as etapas de aspiração folicular, seleção dos oócitos, maturação, fecundação e cultivo embrionário *in vitro* com meio de MIV suplementado com Butafosfan realizadas no laboratório da empresa In Vitro Sul® localizado no município de Pelotas, Rio Grande do Sul (RS). As mesmas etapas da PIV realizadas com meios de MIV suplementados com PON1 foram desenvolvidas na EMBRAPA Estação Terras Baixas, no município de Capão do Leão, RS. As etapas de análises moleculares do experimento foram realizadas no laboratório de Bioquímica Clínica e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

Em ambos os laboratórios de PIV, foram utilizados ovários provenientes de abatedouro local para a obtenção de oócitos viáveis. Os ovários coletados foram acondicionados em recipiente estéril contendo solução salina (NaCl a 0,9%) suplementada com antibiótico, mantidos a 32-35ºC até o laboratório. Com a ajuda de uma bomba de vácuo (Figura 1), foi realizada a aspiração dos folículos com diâmetro entre 2 e 8mm, que foram armazenados em tubos falcon de 15ml. O conteúdo foi filtrado e colocado em uma placa de Petri contendo meio de lavagem e com ajuda do estereoscópio (40x), foi realizada a procura e seleção dos oócitos quanto à qualidade morfológica (DE LOOS et al, 1991). Os oócitos selecionados foram transferidos para outra placa contendo 4ml de meio de lavagem.

Figura 1 - Aspiração folicular de ovário bovino através da utilização de uma bomba de vácuo.

Experimento 1 – Adição de Butafosfan no meio de MIV

Após a seleção, foram utilizados 100 oócitos, divididos aleatoriamente e transferidos para tubos de incubação conforme os tratamentos, sendo 25 oócitos por tratamento. Desta maneira, foram realizados quatro tratamentos de acordo com a adição de Butafosfan ao meio de MIV, sendo T_0= 0,0 mg/L, T_1= 50mg/L, T_2= 100mg/L e T_3= 200mg/L de Butafosfan, tendo 8 repetições de cada tratamento, totalizando 800 oócitos. Os oócitos permaneceram 24h no meio de maturação (CENNATE®, Pedro Leopoldo – MG – Brasil), em estufa à 39ºC em 5% de CO_2.

Experimento 2 – Adição de PON1 no meio de MIV

Após a seleção, foram utilizados 200 oócitos, divididos de forma aleatória em quatro tratamentos contendo 50 oócitos e doses crescentes, sendo T_0= 0,0,T_1= 0,02, T_2=0,04 e T_3=0,08mg/mL de PON1 recombinante humana (rPON1) (Chesapeake PERL Inc., Savage, EUA). Foram realizadas 8 repetições totalizando 1600 oócitos. Os oócitos permaneceram por 24h no meio de MIV (Biotecnologia Animal®, Brasília, DF, Brasil), em estufa à 39°C em 5% de CO_2.

3.2 Fecundação *in vitro*

Faltando entre 1h e 1h30min para o final da maturação foi realizada a preparação do sêmen. Foram utilizadas doses de um mesmo touro e de uma única partida. O sêmen foi descongelado em banho-maria a 35°C por 30seg e foi retirada uma alíquota do sêmen para avaliação da motilidade e vigor. A seleção espermática foi realizada através de gradiente de mini Percoll®.

Após a maturação, os oócitos foram transferidos para o meio de FIV. A incubação dos oócitos com os espermatozoides foi de 22-24h à 39°C em estufa com 5% de CO_2. O dia da FIV foi considerado como dia 0 (D0) do cultivo.

3.3 Cultivo e avaliação embrionária

Após o período de FIV, os prováveis zigotos foram retirados do meio de FIV e submetidos ao desnudamento (remoção das células do *cumulus*) e retirada de espermatozoides através de lavagem em meio MIV-T (meio *in vitro* de transporte) e meio de cultivo (Experimento 1 - CENNATE®, Pedro Leopoldo – MG – Brasil e Experimento 2 - Biotecnologia Animal®, Brasília - DF - Brasil). Em seguida, os prováveis zigotos foram transferidos à placa de cultivo previamente preparada. Os zigotos permaneceram em estufa à 39°C, acondicionados em *bags* com 5% CO_2, 5% O_2 e 90% de N_2 durante 7 dias (Figura 2).

Figura 2 – Placa com zigotos bovinos acondicionados em bags com 5% CO_2 + 5% O_2 + 90% N_2, durante 7 dias.

Após 48h da fecundação foi realizada a avaliação da clivagem (número clivados/número clivados). A taxa de desenvolvimento embrionário no experimento 1

(n° de blastocistos/n° de oócitos inseminados) e no experimento 2 (número de blastocistos/número de clivados) foi avaliada no sétimo dia de cultivo (D7). No D7de cultivo, os embriões de cada grupo foram transferidos a microtubos contendo Trizol, sendo homogeneizados e armazenados a -70ºC até avaliação.

3.4 Extração de RNA total

Experimento 1 – Adição de Butafosfan no meio de MIV

Para realizar o isolamento do RNA total, em cada amostra, foram adicionados 100µl de Trizol e posteriormente as amostras foram homogeneizadas no vórtex rapidamente. Após, foram adicionados 40µl de clorofórmio e homogeneizadas no vótex novamente e colocadas no gelo por 15min.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15min em 7727xg à 4ºC. Após, foi transferido o sobrenadante para um novo tubo eppendorf, no qual, foram adicionados 128µl de álcool isopropílico. Feito isso, as amostras foram homogeneizadas no vórtex rapidamente e foram colocadas no ultra freezer durante 15min à -80ºC. Após foram centrifugadas novamente por 15min em 7727xg à 4ºC. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 400µl de etanol 70% e centrifugou-se por 5min em 3018xg, à 4ºC.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado novamente e os tubos foram colocados invertidos sobre papel toalha até a secagem completa do tubo, após foram adicionados 10µl de água milli-Q e as amostras foram armazenadas no ultra freezer à -80ºC.

Experimento 2 – Adição de PON1 no meio de MIV

No segundo experimento, para realizar isolamento do RNA total, as amostras foram homogeneizadas no vortex após a adição de 100µl de Quick-Zol (Ludwig Biotec LTDA., Alvorada, RS, Brasil). Posteriormente, foram adicionados 40µl de clorofórmio e então as amostras foram homogeneizadas e incubadas a temperatura ambiente durante 3min. Com isso, as amostras foram centrifugadas por 15min em 7727 xg à 4ºC e foram transferidos 80µl do sobrenadante para um novo microtubo contendo 160µ de isopropanol frio

As amostras foram transferidas para um sistema de purificação de coluna comercial (RNeasy®MicroarrayTissue Mini Kit, QIAGEN®Hilden, NW, Alemanha) e foram tratadas com DNase (RNase-freeDNase Conjunto, QIAGEN®) seguindo as instruções do fabricante. Para finalizar, o RNA foi eluido com 15 µL de água ultrapura e armazenado em microtubos.

Para as demais análises nos dois experimentos, a concentração de RNA foi padronizada utilizando NanoDrop Lite (ThermoScientific®, Massachusetts, EUA).

3.5 Confirmação da integridade do RNA total

A confirmação de integridade das amostras do RNA total extraído, foi realizada a partir da eletroforese em gel de agarose, utilizando 220ml de solução tampão eletrolítico (TBE) 0,5X (KOCH; ANDRADE, 2008) e 2,15g de pó de agarose (Agarose LE – 100g, Uniscience, SP, Brasil), os quais foram colocados em um frasco e homogeneizados. Essa solução (agarose + TBE) foi aquecida no micro ondas até ficar translucida. Após, foi resfriada, colocada na cuba e foram inseridos os pentes, para confecção dos poços. Posterior à polimerização do gel, os pentes foram retirados cuidadosamente.

Foi pipetado primeiramente 3,0µl de loading buffer em parafilme (Figura 3) e após foi pipetado 1,5µl de cada amostra sobre o corante, procedendo-se com a homogeneização no parafilme através da pipeta e posteriormente esse misto (*loading buffer* + amostra) foi pipetado nos poços do gel de agarose (Figura 4). Além disso, foram pipetadas duas amostras controle.

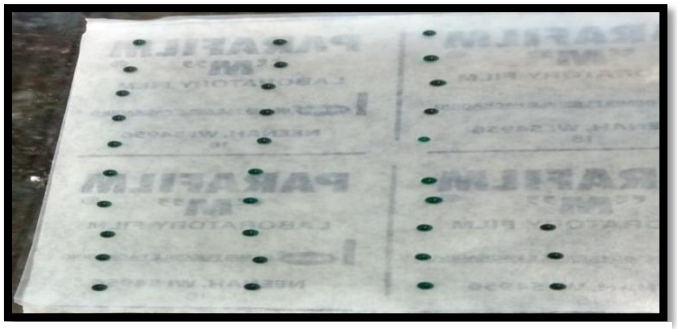

Figura 3 - *Loading buffer* (3,0µl) pipetado em parafilme.

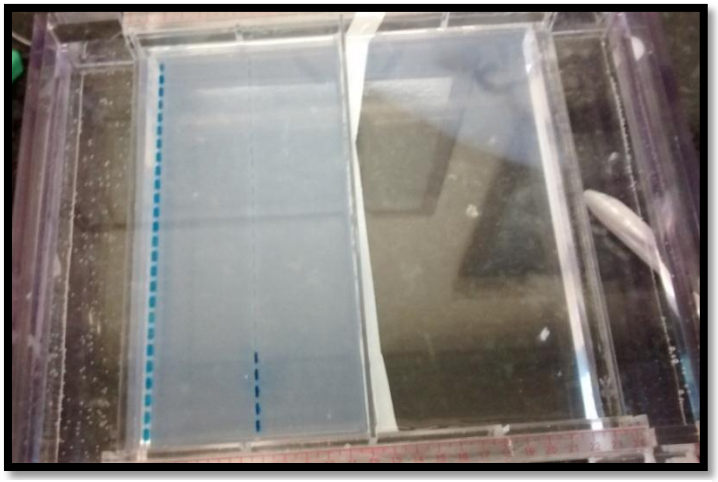

Figura 4 – *Loading buffer* e amostras nos poços do gel de agarose, na cuba de eletroforese.

A corrida teve duração de 1h30min à 80v. A revelação do gel foi realizada através do fotodocumentador, utilizando o software L-PIX Image (Locus Biotecnologia, Software de Captura de Imagem).

Experimento 1 – Adição de Butafosfan no meio de MIV

No primeiro experimento, as amostras não ficaram aparentes, apenas as duas amostras controle. Desta forma, o gel foi repetido e novamente apenas as amostras controle ficaram evidentes. Com isso, foi concluído que as amostras estavam degradadas sem motivo claro. Suspeita-se que tenha ocorrido armazenagem incorreta das mesmas ou até mesmo, queda de energia em determinado período de armazenagem, a qual pode ter causado a degradação das amostras, sabendo que RNA é extremamente vulnerável (BUSTIN, 2000; NOLAN, 2006). Sendo assim, não se prosseguiu com as demais análises moleculares, por ser impossível realizar expressão gênica das mesmas.

Experimento 2 – Adição de PON1 no meio de MIV

No segundo experimento, as amostras foram visualizadas facilmente no gel, afirmando a integridade do RNA. Com isso, foi possível realizar as análises moleculares a seguir.

3.6 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA, foi utilizado 13µl do RNA extraído, utilizando iScript™Synthesis Kit (BIORAD, Hercules, CA, EUA) no volume de 20µL incubados por 5min à 25°C, 30min à 42°C e 5min à 85°C (MyCycler™ThermalCycler, BIO RAD).

3.7 Expressão gênica

A expressão gênica foi avaliada mediante a técnica de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) a qual, foi realizada usando o corante *Syber*. As curvas padrão para os oligonucleotídeos iniciadores, foram feitas para determinar a eficiência de amplificação dos genes alvos e de referência. A RT-qPCR foi realizada num sistema ABI 7500 (Apllied- Biosystens) com 100nM de iniciadores, conforme tabela 1 e 5-10ng de cDNA. Expressão de mRNA alvo foi normalizada para a expressão do gene Histona H2A e expressa como um valor relativo usando o método de comparação de ciclo limiar ($2^{-A-B}/2^{C-D}$) (em que A é o valor limiar do ciclo [Ct] para o gene de interesse na primeira amostra do controle; B, o valor de Ct para o gene de interesse na amostra analisada; C, o valor de Ct para o gene Histona H2A na primeira amostra do controle e D, o número Ct para o gene Histona H2A na amostra analisada).

A primeira amostra do controle foi expressa como 1,00 e todas as outras amostras foram calculadas em relação a este valor. Com isso, os resultados do T_0= 0,0 mg/mL rPON1 (controle) foram ponderadas, e todos os outros resultados foram divididos pelo valor médio da expressão relativa do controle, para se obter a mudança na expressão dos genes de interesse em comparação com o grupo de controle (MASTERNAK et al, 2005). Foram analisadas as expressões de mRNA dos genes reguladores de algumas das vias metabólicas, como: BAX, BCL2 e MnSOD dos embriões acima descritos.

Tabela 1- Sequência específica de *primers* utilizados para RT-PCR para os genes BCL2, BAX, MnSOD e H2A (GYU-JIN et al, 2007).

Genes	*Primers*
BCL-2l	For- GATGACTTCTCTCGGCGCTAC Rev- GTGCCTTCAGAGACAGCCAG
BAX	For- TGCAGAGGATGATCGCAGCTGTG Rev- CCAATGTCCAGCCCATCATGGTC
MnSOD	For- CCCATGAAGCCCTTTCTAATCCTG Rev- TTCAGAGGCGCTACTATTTCCTTC
H2A	For- AGGACGACTAGCCATGGACGTGTG Rev- CCACCACCAGCAATTGTAGCCTTG

A análise estatística foi realizada através do procedimento GLM no programa SAS (SAS, Cary, NC, EUA) para o teste do efeito linear, quadrático e cubico da adição de doses crescentes de Butafosfan e rPON1 no meio de maturação sobre a taxa de clivagem, produção de embriões no D7 e expressão dos genes BAX, BCL2 e MnSOD no cultivo de embriões. Além disso, realizou-se o teste de correlação de Pearson entre o nível de atividade de rPON1 e a taxa de blastocisto no D7 do cultivo embrionário.

4 Resultados e Discussão

Experimento 1 – Adição de Butafosfan no meio de MIV

As taxas de clivagem, assim como a produção de embriões no D7 de cultivo nos tratamentos contendo 0,0, 50, 100 e 200mg/L T_0, T_1, T_2 e T_3 respectivamente, não diferiram entre tratamentos (P>0,05, Tabela 2).

Tabela 2– Taxa de clivagem e percentual de embriões bovinos no dia 7 de cultivo, de acordo com a adição de Butafosfan no meio de maturação *in vitro* (P>0,05).

% de embriões no D7 sobre a MIV									
		T_0		T_1		T_2		T_3	
Nº de Rotinas	N° de Oócitos por rotina	% Embriões	% Clivag	% Embriões	% Clivag	% Embriões	% Clivag	% Embriões	% Clivag
8	100	34,7	57,25	28,5	63	33,5	61,87	31,6	54,87

Clivag: Clivagem.

Estes resultados podem ter sido influenciados pela qualidade dos oócitos escolhidos, sendo todos de boa qualidade, dificultando a visualização da ação da molécula de Butafosfan. Possivelmente, a utilização de oócitos de menor qualidade possibilite o aparecimento do efeito do Butafosfan, por possuírem maior debilidade energética.

Para que o oócito tenha bom desenvolvimento *in vitro*, é necessário conter reservas citoplasmáticas, como proteínas e RNAm, o qual é adquirido antes da maturação, no ambiente folicular (ARLOTTO et al, 1996; CAMARGO et al, 2006; LI; ALBERTINI, 2013). Além disso, sugere-se que a resposta das doadoras aos tratamentos de superovulação, pode afetar a qualidade dos oócitos (PEIXOTO et al. 2002) e ainda que fatores como ECC, BEM, concentrações sanguíneas de progesterona e estradiol, entre outros, também podem afetar a viabilidade do oócito

(SARTORI; GUARDIEIRO 2010). Com isso, os resultados podem ter sido influenciados pelo desenvolvimento anterior a maturação, no ambiente materno, pois os oócitos foram obtidos de abatedouros e se desconhece as características das doadoras.

Mesmo que neste estudo, as taxas de clivagem e produção de embriões *in vitro* não tenham diferido entre tratamentos, podem ter ocorrido alterações nas expressões gênicas, as quais não foram possíveis de ser realizadas neste experimento, conforme descrito no item 3.5.

Experimento 2 – Adição de rPON 1 no meio de MIV

As taxas de clivagem foram de 81,7%, 85,1%, 81,0% e 82,5% para os tratamentos contendo 0,0, 0,02, 0,04 e 0,08mg/mL de rPON1 respectivamente. Não houve diferença entre tratamentos (P>0,05). No entanto, foi observado efeito linear positivo na produção embrionária de acordo com a adição de rPON1 no meio de MIV (P<0,0001). A produção de embriões em D7 foi de 22,1%; 29,2%; 31,7% e 33,8% nos tratamentos contendo 0,0, 0,02, 0,04 e 008mg/mL de rPON1 respectivamente (Figura 5). Além disso, este efeito foi confirmado pela correlação positiva entre a adição da rPON1 no meio MIV e a taxa de blastocistos no D7 (r=0,35; P=0,04). A expressão dos genes BAX, BCL-2 e MnSOD nos embriões não foi afetada pela adição de rPON1 (Tabela 3).

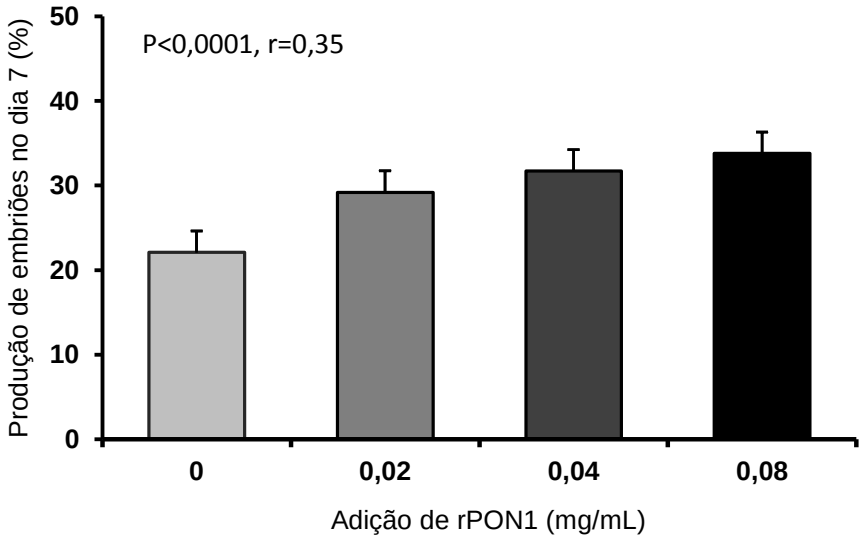

Figura 5 - Produção de embriões bovinos no dia 7 de acordo com a adição de doses crescentes de rPON1 durante a maturação oocitária *in vitro.*

Tabela 3 - Expressão relativa dos genes BAX, BCL-2 e MnSOD nos embriões, após adição de rPON1 no meio MIV, no D7.

rPON1 (mg/µL)	Genes		
	BAX	BCL-2	MnSOD
0.00	1,00 ±0,23	1,00 ±0,48	1,00 ±0,36
0.02	2,58 ±0,36	0,61 ±0,31	1,15 ±0,45
0.04	2,33 ±0,63	0,40 ±0,20	0,87 ±0,28
0.08	1,27 ±0,69	0,76 ±0,47	0,43 ±0,15

P>0,05

Vários autores descrevem um aumento no número e qualidade de embriões provenientes de MIV suplementada com diversas moléculas sem a constatação de diferenças nas taxas de clivagem (GUEMRA et al, 2013; ROCHA, 2013; PEREIRA, S. 2013). Dessa forma, a qualidade da maturação do oócito não pode ser medida somente pela taxa de clivagem.

Um dos fatores que é responsável pela baixa eficiência da PIVE, é o estresse oxidativo, que ocorre a partir do desequilíbrio entre a formação excessiva de EROs e/ou a diminuição de antioxidantes (WANG et al, 2002; AGARWAL et al, 2005), podendo causar alterações em lipídeos, proteínas, ácidos nucléicos e até mesmo bloquear o desenvolvimento embrionário, levando a apoptose (WANG et al, 2002).

Os resultados observados nesse experimento demonstraram que a rPON1 proporcionou um aumento no número de embriões no D7. Esses dados sugerem que a rPON1 aumenta o número de embriões através da melhora na qualidade das membranas celulares, fazendo com que não altere sua permeabilidade, pois confere proteção contra danos provenientes do estresse oxidativo através da sua capacidade de diminuir a susceptibilidade das membranas à peroxidação, hidrolisar peróxidos lipídicos e prevenir o aumento das EROs (DURRINGTON et al, 2001).

Não houve diferença entre os tratamento quanto à expressão dos genes BAX, BCL-2 e MnSOD no embriões em D7. Nesta fase, os embriões estavam em estágio de blastocisto inicial e expandido, consequentemente é possível que o padrão de expressão gênica desses embriões tenha sido muito semelhante. No entanto, a avaliação da expressão gênica logo nos primeiros dias de cultivo poderia ter demonstrado um padrão diferente de expressão dos genes avaliados.

5 Considerações Finais

Neste estudo, o Butafosfan provavelmente não apresentou melhora na produção de embriões bovinos. Entretanto, podem ter ocorrido modificações nas expressões gênicas dos embriões, que não puderam ser identificadas.

A suplementação com rPON1 no meio de MIV não apresentou efeito sobre a taxa de clivagem. No entanto, proporcionou aumento no número de embriões no D7. Já a expressão dos genes BAX, BCL-2 e MnSOD nos embriões não foi afetada pela adição de rPON1.

6 Perspectivas Futuras

Para melhor elucidar a ação da molécula de Butafosfan e PON1, é necessário realizar novos experimentos, utilizando oócitos de diferentes qualidades e além disso avaliar a ação do Butafosfan e PON1 em outras fases da PIV, para melhor elucidar as suas ações.

A dosagem utilizada de Butafosfan, pode não ter sido a ideal, pois este estudo foi o primeiro a utilizar está molécula na maturação oocitária, sendo necessário realizar outros estudos com dosagens diferentes.

Contudo, este trabalho foi de extrema importância para a minha formação acadêmica, pois possibilitou crescimento científico e profissional, permitindo concluir a graduação de forma satisfatória.

Referências

ARLOTTO, T et al. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.45, p.943-956, 1996.

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.3, n.28, 2005.

ANDREOTI, M. **Produção in vitro de embriões bovinos: uso da glutationa durante o processo de lavagem e capacitação espermática.** 2007. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Universidade Federal do Pará e da Amazônia. 2007.

BRACKETT, B et al. Normal development following *In vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v.27, p.147-158, 1982.

BUENO, A. P. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 11, 1679-7353p. 2008.

BIONAZ, M. et al. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.1740-1750, 2007.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, New York, v. 25, p.169–193, 2000.

BROWNE, R.W. et al. Distributions of high-density lipoprotein particle components in human follicular fluid and sera and their associations with embryo morphology parameters during IVF. ***Human Reproduction***, v.23, p.1884-1894, 2008.

CARRELL, D.T.; LIU, L.; HUANG, I.; PETERSON, M.; Comparison of maturation, meiotic competence, and chromosome aneuploidy of oocytes derived from two protocols for *in vitro* culture of mouse secondary follicles. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.22, p.347-354, 2005.

CAMARGO, L.S.A. et al. Factors influencing *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction**. v.3, n.1, p.19-28, 2006.

DRAGANOV, D.I.; WATSON, C.E.; BILLECKE, S.S.; LA DU, B.N. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. **The Journal Biological Chemistry**, v.43, p.33435–33442, 2000.

DRAGANOV D.I.; LA DU B.N. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. **Archives of Pharmacology**, v.369, p.78-88, 2004.

DE SOUSA, P. A.; CAVENEY, A.; WESTHUSIN, M.E.; WATSON, A.J. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors. **Theriogenology**, v.49, p.115-128,1998.

DE BEM, T.H.C. et al. The influence of morphology, follicle size and bcl-2 and bax transcripts on the developmental competence of bovine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p.576-583, 2014.

DE LOOS, F. et al. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. **Molecular Reproduction and Development,** v.28, n.3, p.255-259, 1991.

DENIZ, A. et al. Improvement of fertility and control of metabolic disorders in transition cows. **International Dairy Topics**, v. 8, n. 4, 2009.

DURRINGTON, P.N.; MACKNESS, B.; MACKNESS, M.I. Paraoxonase and atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vascular Biology**, v.21, p.473-480, 2001.

FARIN, C.E. et al. The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation *in vitro*. **Animal Reproduction Science,** v.98, p.97-112, 2007.

FERREIRA, E.M. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Science Direct**, São Paulo, v.71, n.1, 836–848p. 2009.

FUJIMOTO, V.Y. et al. High-density lipoprotein metabolism and the human embryo. **Human Reproduction**, v.16, p.20-38, 2010.

FUKUDA, Y et al. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage. **Biology of Reproduction**, v.42, p.114-119, 1990.

GUEMRA, S. et al. Maturação in vitro de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, p.1616-1624, 2013.

GUIMARÕES. Fernando Silva. et al. Contribuição antioxidante do Butafosfan e da cianocobalamina no metabolismo de vacas leiteiras. In: XXII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas, 2013. **Anais 2013**, Ciências Agrárias. Pelotas.

GONÇALVES, P.B.D. et al. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte. v.31, n.2, 212-217P. 2007.

GYU-JIN R.H.O. et al. Influence of In Vitro Oxygen Concentrations on Preimplantation Embryo Development, Gene Expression and Production of Hanwoo Calves Following Embryo Transfer. **Molecular Reproduction and Development**, v.74. n. 1,486–496p, 2007.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Seminars Hematology**, v.26, p.277-285, 1989.

JASPARD, B. et al. Biochemical characterization of pre-beta 1 high-density lipoprotein from human ovarian follicular fluid: evidence for the presence of a lipid core. **Biochemistry**, v.35, p.1352–1357, 1996.

KIM, H.S et al. Effects of repetitive ionomycin treatment on in vitro development of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v.58, n.1, 2012.

KOCH, A.; ANDRADE, F.M. A utilização de técnicas de Biologia Molecular na genética forense: uma revisão. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.40, n.1, p.17-23, 2008.

LAZZARI, G. et al. Embryonic genotype and inbreeding affect preimplantation development in cattle. **Reproduction**, v.141, n.1, p.625–632, 2011.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.37, p.293-303, 2001.

LIMA, M. E. **Efeito do butafosfan e cianocobalamina sobre a produção de oócitos e embriões in vitro de vacas Jersey**. 2014. 43f. Dissertação (Mestrado em Ciências)do programa de de pós-graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas. 2014.

LI, R; ALBERTINI, D. F. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, **V.** 14**,** p. 141-152, 2013.

LONERGAN, P.; FAIR, T. The ART of studying early embryo development: Progress and challenges in ruminant embryo culture. **Theriogenology**, v.81, p.49-55, 2014.

LUCAS, C.G**. Efeito da suplementação com tretinoína no encapsulada na produção in vitro de embriões bovinos**. 2014.66f. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2014.

MASTERNAK, M.N. et al. Caloric restriction results in decreased expression of peroxisome proliferator-activated receptor superfamily in muscle of normal and long-lived growth hormone receptor/ binding protein knockout mice. **The Journals of Gerontology**, v.60, p.1238–1245, 2005.

MESQUITA, L.G. **Bloqueio da fosforilação oxidativa no cultivo de embriões bovinos.** 2005.74f. Dissertação (Mestrado em zootecnia) – Programa de Pós-graduação em zootecnia, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. 2005.

MELLO FILHO, A.C.; HOFFMAN, M.E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochemical Journal**, v.5, p.218:273, 1983.

MEINECKE, B.; JANAS, U.; PODHAJSKY, E.; MEINECKE-TILLMANN, S. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p.183-188, 2001.

MOTA, L.H.C.M. et al. Influência da somatotropina recombinante bovina (rbST) na produção in vitro de embriões em vacas leiteiras: uma revisão. **Pubvet**, Londrina: v.6, n.32, p.1456, 2012.

NABHAN, T. et al. Influência da raça do touro (Bosindicus x Bostaurus) na tolerância ao estresse térmico calórico de embriões bovinos produzidos in vitro. Brazilian

Journal of Veterinary Research and Animal Science, São Paulo, v.48, n.4, p.332-335, 2011.

NOLAN, T.; HANDS, R.E.; BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nature Protocols**, New York, v.1, p.1559-158, 2006.

PARRA, B. C.et al. Aspecto sanitário na transferência de embriões de bovinos. **Revista Cientifica Eletrônica de Medicina Veterinária**, São Paulo. v.10, 2008.

PEREIRA, R.A. et al. Effect of butaphosphan and cyanocobalamin on post partum metabolism and milk production in dairy cows. **Animal**, p.1-5, 2013.

PEREIRA, R.A. et al. Metabolic parameters and dry matter intake of ewes treated with butaphosphan and cyanocobalamin in the early postpartum period. **Small Ruminant Research**, v.114, p.144-145, 2013.

PEREIRA, Sidney Alcântara. **Efeito da Presença da Insulina-Transferrina-Selênio (ITS) e L-ácido Ascórbico (AA) na Produção in vitro de Embriões Bovinos**. 2013. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

PEDERNERA, M. Effect of diet, energy balance and milk production on oxidative stress in early-lactating dairy cows grazing pasture. **The Veterinary Journal**, Camden, v. 186, n. 3, p. 352-357, 2009.

PEIXOTO, M.G.C.D et al. Análise multivariada de resultados da ovulação múltipla seguida de transferência de embriões de doadoras zebuínas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.5, 2002.

PENINO, N. et al. **Butafosfan e a Vitamina B12 no sêmen fresco e refrigerado de garanhões**. Dissertação Mestrado. 2013. 56f. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2014.

PEZZULO, A.A. et al. Expression of human paraoxonase 1 decreases superoxide levels and alters bacterial colonization in the gut of Drosophila melanogaster. **PLOS ONE**, v. 7, p.43777, 2012.

PINTO, R.F.P Efeitos do FGF10 na maturação oocitária e produção de embriões bovinos in vitro. 2012. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Intituto de Biociências, Universidade Estadual de Paulista, Botucatu, 2012.

REIS, A.; METELO, R.; SANTOS, P.; DA SILVA, F.M. Efeito da estrutura ovárica e da idade de bovinos da raça HolsteinFriesian na quantidade e qualidade de ovócitos e de embriões produzidos in vitro. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v.43, n.5, p.629-636, 2006.

ROCHA, Nathália Alves de Souza. **Efeitos de antioxidantes e da atmosfera gasosa em diferentes etapas da produção in vitro sobre o desenvolvimento e criotolerância de embriões bovinos.** 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

ROLLIN, E. et al. The effect of injectable butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum serum beta-hydroxybutyrate, calcium, and phosphorus concentrations in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**.v.93,p. 978–987, 2010.
RUMPF, Rodolfo. Avanços metodológicos na produção in vitro de embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v.36, n.1, p.229-233, 2007.

SARTORI; R.; GUARDIEIRO, M.M. Fatores nutricionais associados à reprodução da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.39, p.422-432, 2010.

SCARAMUZZI, R. J. et al. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.23, p.444–467, 2011.

SECRETARIA DE PLANEJAMENTO, GESTÃO E PARTICIPAÇÃO CIDADÃ DO RIO GRANDE DO SUL – SEPLAG. 2014. Disponível em: http://www.scp.rs.gov.br/atlas/conteudo.asp?cod_menu_filho=819&cod_menu=817&tipo_menu=ECONOMIA&cod_conteudo=1580. Acessado em: 27 de outubro de 2014.

SCHRADER, C; RIMBACH, G. Determinants of paraoxonase 1 status: genes, drugs and nutrition. **Current Medicinal Chemistry**, v.18, p.5624-5643, 2011.
SCHNEIDER, A. et al. Paraoxonase (PON) 1, 2 and 3 Expression in Granulose Cells and PON1 Activity in Follicular Fluid of Dairy Cows. **Reproduction in Domestic Animals**, Nova Iorque, v.48, p.989-994,2013.

SCHNEIDER, A; CORREA, M.N; BUTLER, W.R. Short communication: acute phase proteins in Holstein cows diagnosed with uterine infection. **Research in Veterinary Science**. n.95, p.269-271, 2013.

TABELEAO, V. et al. **Efeito do Butafosfan no metabolismo de vacas leiteiras saudáveis ou com mastite clínica**. 2014. 82f. Tese (Doutorado em biotecnologia)

Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2014.

TURK, R. Lipid mobilization and oxidative stress as metabolic adaptation processes in dairy heifers during transition period. **Animal Reproduction Science**, Zagreb, v.141, p. 109-115, 2013.

YANG, M.Y; RAJAMAHENDRAN, R. 2002: Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. **Animal Reproduction Science**, v.70, p.159–169, 2002.

WANG, X.; FALCONE, T.; ATTARAN, M.; GOLDBERG, J.M., AGARWAL, A.; SHARMA, R.K. Vitamin C and Vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility and Sterility**, v.78, p.1272-1277, 2002.