

ANTIOXIDANTES NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS OVINOS

**PRADIEE, JORGEA¹; SANTOS, ELISA C.S.¹; GONÇALVES, ALEXANDER¹;
LAZZARI, JOSÉ C.¹; CARDOSO, TAINÃ¹; PEGORARO, LÍGIA M.C.²**

¹Universidade Federal de Pelotas- jpradiee@veterinaria.med.br

²EMBRAPA – ligia.pegoraro@cpact.embrapa.br

1. INTRODUÇÃO

A maturação *in vitro* (MIV) é a primeira etapa na produção *in vitro* de embriões. Nesta fase ocorre uma série de eventos envolvendo a maturação nuclear, que é a retomada da meiose pelo oócito. Dentro do folículo ovariano o oócito encontra-se na fase de dictióteno, ao ser retirado deste ambiente retoma a meiose, chegando à fase de metáfase II, característica de maturidade oocitária.

Já a maturação citoplasmática, é a reorganização das organelas celulares, tomando uma nova configuração espacial. Todos estes eventos devem ser síncronos para que o oócito esteja apto para ser fecundado. Assim, na espécie ovina o tempo requerido pelo oócito para adquirir tal competência é de 18 a 24h, em estufa de CO₂ em umidade saturada. Porém, outros fatores interferem na MIV, como os agentes oxidativos formados do metabolismo da própria célula, como espécies reativas de oxigênio e radicais livres. Estes podem ser neutralizados com a adição de antioxidantes no meio de maturação. Dentre eles, o B-mercaptoetanol (β ME) e a cisteína (CIS) (BAI, et al 2008), agentes antioxidantes, associados ao meio de maturação poderiam ser uma alternativa.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a maturação nuclear dos oócitos submetidos à MIV com a suplementação de 100 μ M de β ME e 600 μ M de CIS.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para obtenção dos complexos cumulus-oócitos (COC) foram realizadas 6 repetições de coletas de ovários de ovelhas púberes obtidos em abatedouro. Os ovários foram mantidos a 30°C em solução salina e antibiótico durante o transporte do frigorífico ao laboratório, onde se procedeu a recuperação através da técnica slicing e seleção dos CCOs em lupa estereomicroscópica.

Os CCO selecionados para MIV foram utilizados na constituição de dois tratamentos: (100 μ M de β ME e 600 μ M de CIS) β ME/CIS (n=154) e controle (n=157).

A MIV foi realizada em meio TCM 199 adicionado de estradiol, FSH/LH, piruvato, soro de ovelha no cio e antibióticos, durante 22-24h em estufa a 39°C e 5% CO₂. Após este período foram removidas as células do cumulus e os oócitos corados com solução de coloração composta de Hoechst 33342 (5 μ g/ml)(Sigma), durante 15 min a 38°C, para avaliação da maturação nuclear em microscópio de fluorescência. Classificando os oócitos como: vesícula germinativa (VG), quebra ou rompimento da vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI) e metáfase II (MII).

Dados paramétricos foram analisados pelo teste ANOVA e não paramétricos pelo Kruskal Wallis, analisados pelo software Statistix 9.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos para os parâmetros de VG e QVG. Porém diferiram para MI (4,8% Controle e 16,7% β ME/CIS) e MII 50,4% Controle e 26,8% β ME/CIS), conforme Tabela 1.

Tabela1. Porcentagens dos parâmetros: metáfase I (MI), metáfase II (MII), quebra de vesícula germinativa (QVG) e vesícula germinativa (VG) entre os tratamentos controle e β ME/Cis.

| Tratamento | MI (%) | MIi (%) | QVG (%) | VG (%) |
|----------------|--------|---------|---------|--------|
| Controle | 4,8 B | 50,4 A | 11,7 A | 14,6 A |
| β ME/Cis | 16,7A | 26,8 B | 17,2 A | 12,2 A |

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Com a associação entre B-mercaptoetanol e cisteína forma-se um composto tiol, que facilita a entrada de cisteína na célula disponibilizando-a para formação da enzima glutatona (GSH) (ISHIII, et al.1988). Com a adição de 25 μ M de β ME no meio de maturação de oócitos suínos aumentou os níveis de GSH e melhorou o desenvolvimento embrionário (ABEYDEERA et al 1998). Assim como a adição de somente cisteína ou cistina no meio de maturação aumentou a síntese de GSH em oócitos bovinos (DE MATOS, et al 1997).

Porém, Bai et al (2008) utilizando a mesma concentração de β ME/Cis não obteve melhora na taxa de maturação nuclear em fêmeas jovens (4 a 8 semanas de idade), corroborando com os resultados do presente trabalho quando obteve-se uma taxa de 26,8% de oócitos maturados com β ME/Cis.

4. CONCLUSÕES

A associação entre B-mercaptoetanol e cisteína nas concentrações utilizadas não possui efeito na maturação *in vitro* de embriões ovinos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEYDEERA, L.R.; WANG, W.H.; CANTLEY, T.C.; PRATHER, R.S.; DAY, B.N.; **Theriogenology**. v. 50. p.747-756. 1998. Presence of b-mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured in vitro and the rate of blastocyst development after in vitro fertilization.

BAI, J.; HOU, J.; GUAN, H.; YAN, F.; CUI, X.; LIU, L.; WANG, S.; AN X. **Theriogenology**. v. 70, p. 758–764, 2008. Effect of 2-mercaptoethanol and cysteine supplementation during in vitro maturation on the developmental competence of oocytes from hormone-stimulated lambs.

DE MATOS, D.G.; FUMUS, C.C.; MOSES, D.F. **Biology of Reproduction**. V. 57. P.1420-1425. 1997. Glutathione synthesis during in-vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells.

ISHII, T.; BANNAIA, S. e SUGITA, Y. **The Journal Of Biologic Chemistry**. V. 256. No. 23, p. 12387-12392, 1981. Mechanism of growth stimulation of L1210 Cells by 2-mercaptoethanol in vitro.