

## **EFEITOS DE ANTIOXIDANTES E DAS CÉLULAS DO *CUMULUS* SOBRE FECUNDAÇÃO E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO BOVINO *IN VITRO*.**

Fernanda Patrícia Gottardi, Gisele Zoccal Mingoti, Letícia Siqueira de Sá Barreto, Fernanda da Silva Gonçalves. – Inter-áreas - Medicina Veterinária - Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal (DAPSA) – Curso de Medicina Veterinária – Campus de Araçatuba.

A maturação oocitária compreende todos os eventos que permitem ao oócito expressar seu potencial máximo de desenvolvimento após a fecundação. Durante a maturação, os oócitos sofrem várias alterações nucleares e citoplasmáticas.

Assim que oócitos são removidos do ambiente inibitório do folículo, os oócitos meioticamente competentes retomam espontaneamente o processo de meiose. Porém, uma fração destes oócitos não adquire plena competência citoplasmática, pois as ações capacitantes que o folículo dominante exerce sobre o oócito são abolidas devido à remoção do oócito do folículo e subsequente cultivo de maturação *in vitro*.

As células foliculares participam da regulação do crescimento do oócito por meio de fornecimento de nutrientes e regulação da maturação meiótica. Numerosos estudos ultraestruturais demonstraram queda substancial na comunicação intercelular durante a maturação *in vivo* e *in vitro* de COCs de mamíferos, sugerindo que a perda das “gap junctions” induzidas pelo LH leva à retomada da meiose por reduzir o transporte para o oócito de substâncias inibitórias da maturação, originárias das células somáticas do folículo.

Por outro lado, alguns estudos demonstraram que o oócito não perde totalmente a ligação com as células do *cumulus* após a retomada da meiose. A remoção das células do *cumulus* antes da fertilização compromete a fertilização e o desenvolvimento do embrião comparada à retirada das células do *cumulus* após a fertilização.

Além da participação das células foliculares no processo de maturação do oócito, tem sido demonstrado que o sistema de cultivo de maturação exerce profundos efeitos na aquisição da competência do oócito em se desenvolver um embrião normal após a fecundação. Recentemente tem se dado crescente atenção ao papel da tensão de oxigênio (O<sub>2</sub>) sobre a produção de embriões bovinos *in vitro*.

Em sistemas de cultivo *in vitro*, o estresse oxidativo ocorre quando o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) ultrapassa a capacidade antioxidante do sistema. A alta concentração de O<sub>2</sub> atmosférico induz a geração de radicais livres que são produzidos por várias vias metabólicas e enzimas do oócito, embrião ou das células foliculares (células do *cumulus*) co-cultivadas com estes. Apesar de ter sido demonstrado que as células somáticas co-cultivadas com embriões geram ROS, alguns estudos demonstram que há um melhor desenvolvimento de embriões quando oócitos desnudos são co-cultivados com células do *cumulus*, já que estas sintetizam fatores embriotróficos e removem fatores inibitórios do meio.

O estresse oxidativo danifica os embriões e as consequências incluem alterações mitocondriais, bloqueio de desenvolvimento, depleção do ATP e apoptose. Assim, a adição de antioxidantes ao meio de cultura tem se demonstrado efetiva na manutenção do desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Glutathione (GSH) é um antioxidante natural presente em ambos os gametas, mas em níveis variáveis. A GSH possui um importante papel na proteção da célula contra os danos oxidativos. A adição de cisteína, cisteína e 2-mercaptoetanol ao meio de maturação aumentaram a síntese de GSH no oócito bovino durante a MIV. Este aumento no conteúdo da GSH supre os oócitos maturados *in vitro* de um grande estoque de GSH disponível para proteção do embrião até o estágio de blastocisto, melhorando a eficiência da produção *in vitro* de blastocistos de oócitos imaturos.

O precursor da GSH em oócitos é a cisteína, que pode ter um papel importante como antioxidante quando suplementado em sistemas de cultivo. Cisteína no meio pode reduzir cistina para cisteína e promover o aumento de cisteína suficiente para síntese de GSH. As células do *cumulus*, além de todas suas funções na regulação da maturação do oócito, possuem ainda a capacidade de transformar cistina em cisteína, para então o oócito utilizar para síntese de GSH.

Indubitavelmente, muitos fatores biológicos agem de forma conjunta para preparar o oócito

imaturo para um desenvolvimento bem sucedido, que possa produzir um embrião competente depois da fecundação. A compreensão exata das necessidades metabólicas, do oócito em sistemas de cultivo de maturação *in vitro* pressupõe a necessidade de novas pesquisas até que seja estabelecida a condição ideal para que o maior número possível de oócitos maturados *in vitro* adquiram a competência de desenvolvimento e torne-se hábil para sustentar o desenvolvimento inicial do embrião. Com este intuito, este trabalho buscou acrescentar informações referentes às necessidades metabólicas e/ou fisiológicas para a adequada capacitação e maturação do oócito para que, baseado nestas necessidades, se possa definir um sistema de cultivo que aumente a produção *in vitro* de embriões bovinos.

Para isso ovários de bovinos abatidos foram retirados das carcaças, aproximadamente 20 minutos após o abate, mantidos em solução salina estéril a 30-35°C e transportados para o laboratório em caixas térmicas, não excedendo o limite de 4 horas desde o abate até o início das aspirações. As punções foliculares foram realizadas manualmente, por meio de agulha de calibre 18-G, adaptada a seringa de 20 ml, ambas descartáveis. Todo o material aspirado, transferido para tubos plásticos de 50 ml, ficou decantando por 15 minutos para seleção dos oócitos.

Os oócitos de *cumulus* compacto com pelo menos 4 camadas de células e de aparência saudável (citoplasma de granulação homogênea) foram selecionados para o cultivo de maturação.

Esses selecionados foram lavados duas vezes em meio de lavagem H-199 (constituído por meio TCM-199, suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 20 mM de HEPES, 5 mM de Bicarbonato de sódio, 75 µg de Gentamicina/mL) e então transferidos para placa de cultura contendo meio de maturação B-199 constituído por meio TCM-199 suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 25 mM de Bicarbonato de Sódio, 75 µg de Gentamicina/mL, 1 µg de 17-β Estradiol/mL, 0,5 µg de FSH/mL, 100 UI de hCG/mL e 0,6% de BSA (Grupo Controle), no qual foi ainda adicionado 50 µM de Cisteamina para o Grupo Cisteamina (antioxidante).

Os oócitos selecionados foram ainda subdivididos para a maturação em 3 diferentes categorias, de acordo com classificação morfológica: 1) inclusos nas células do *cumulus* (COC); 2) desnudos das células do *cumulus* sem co-cultivo com células do *cumulus* (DO); 3) desnudos das células do *cumulus* em co-cultivo com as próprias células do *cumulus* removidas (DO+CC); estes foram desnudados em 20 µl de meio de maturação no vórtex por cinco minutos e então colocados na gota de maturação junto com esse meio no qual foram desnudados.

O cultivo de maturação foi conduzido durante 24 horas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar.

A fecundação foi realizada 24 horas após o início do cultivo da maturação. Uma palheta de sêmen foi descongelada à temperatura de 35-37°C por 30 segundos e os espermatozóides vivos foram separados do diluidor por sedimentação em gradiente descontínuo de Percoll de duas fases (90 e 45 %), em 900 x g de força de sedimentação, durante 30 minutos. O sedimento foi diluído uma vez em solução de 1 mg de heparina/ml em meio Talp-sêmen e incubado a 38,7° C por 15 minutos. Após avaliação da motilidade progressiva e da concentração, o número de espermatozóides foi ajustado para 25 x 10<sup>6</sup> por ml com meio FIV-Gotas. Aproximadamente 100x10<sup>3</sup> espermatozóides foram adicionados à cada gota de 100 µl de meio FIV-Gotas designado a cada grupo experimental. Os oócitos foram lavados uma vez em meio FIV-Gotas, sendo então adicionados às gotas de FIV. A fecundação foi realizada a 38,7° C, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> em ar, por 24 horas.

O cultivo foi realizado em microgotas de 100 µl de meio SOF-Modificado suplementado com 0,5% de BSA e 2,5% de SFB à temperatura de 38,7° C. A cada 48 horas de cultivo, 50% do volume da microgota foi renovado.

Ao todo foram fecundados 558 oócitos, em cinco repetições para cada grupo. Foi analisada a taxa de blastocistos (168 horas pós-inseminação – hpi) e de eclosão (192 hpi). Os dados foram analisados por ANOVA (P<0,05) considerando-se um experimento fatorial (2 grupos x 3 [COC, DO ou DO+CC])

Pudemos observar que a ruptura da integridade entre células do *cumulus* e oócito influenciou negativamente o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos as 168 hpi (Tabela 1) e a eclosão as 192 hpi (Tabela 2), nos grupos controle e nos grupos cisteamina.

Tabela 1– Porcentagem de blastocistos analisados 168 horas após fecundação nos diferentes tratamentos.

Fase de desenvolvimento embrionário	Grupo	Meio de Maturação	
		Controle	Cisteamina
BLASTOCISTOS (%)	COC	43,5 ± 3,1 <sup>aA</sup>	41,6 ± 5,6 <sup>aA</sup>
	DO	21,5 ± 3,21 <sup>bA</sup>	7,1 ± 3,0 <sup>bB</sup>
	DO+CC	17,5 ± 5,1 <sup>bA</sup>	10,5 ± 2,9 <sup>bA</sup>

COC = complexo-*cumulus*-oócito, DO = oócito desnudo, DO+CC = oócito desnudo cultivado juntamente com as células do *cumulus* que foram removidas. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna (<sup>ab</sup>), e maiúsculas diferentes na linha (<sup>AB</sup>) diferem entre si (P<0,05).

Tabela 2 – Porcentagem de blastocistos eclodidos analisados 192 horas após fecundação nos diferentes tratamentos.

Fase de desenvolvimento embrionário	Grupo	Meio de Maturação	
		Controle	Cisteamina
BLASTOCISTOS ECLODIDOS (%)	COC	21,3 ± 5,1 <sup>aA</sup>	21,0 ± 2,7 <sup>aA</sup>
	DO	2,0 ± 2,0 <sup>bA</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>bA</sup>
	DO+CC	5,2 ± 3,3 <sup>bA</sup>	4,0 ± 2,9 <sup>bA</sup>

COC = complexo-*cumulus*-oócito, DO = oócito desnudo, DO+CC = oócito desnudo cultivado juntamente com as células do *cumulus* que foram removidas. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna (<sup>ab</sup>), e maiúsculas diferentes na linha (<sup>AB</sup>) diferem entre si (P<0,05).

Com relação ao efeito de antioxidantes no meio de MIV, observamos que a presença ou não de cisteamina não influenciou o desenvolvimento embrionário, pois este foi semelhante entre os grupos (P>0,05). A exceção foi com relação ao grupo de oócitos desnudos maturados com cisteamina, pois neste caso a porcentagem de blastocistos totais às 168 (Tabela 1) horas após fertilização foi menor (P<0,05) do que dos oócitos desnudos maturados sem cisteamina.

Conclui-se que a integridade dos COCs durante a MIV (oócitos cultivados com células do *cumulus*) é fundamental para a capacitação e aquisição da competência dos oócitos para um bom desenvolvimento embrionário posterior, visto que estes oócitos tiveram melhor taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário após a fecundação em comparação aos oócitos desnudos (DO) e os desnudos co-cultivados com células do *cumulus* (DO+CCs). Ainda, a presença da cisteamina no meio de maturação não influenciou na taxa de clivagem e no desenvolvimento embrionário.

## Referências Bibliográficas

BARRETTO, L.S.S. Avaliação dos efeitos do IBMX e da roscovitina sobre a maturação nuclear, momento de fecundação e competência no desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos. 2003. 92p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2003.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F. Glutathione synthesis in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. **Biology of Reproduction, New York**, v.57.p. 1420-5, 1997

HYSLOP, P.A.; HINSHAW, D.B.; HALSEY, W.A.Jr.; SCHRAUFSTATTER, I.U.; SAUERHEBER, R.D.; SPRAGG, R.G.; JACKSON, J.H.; COCHRANE, C.G. Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. **Journal of Biological Chemistry**, v.263(4), p.1665-1675, 1988.

LARSEN, W.J.; WERT, S.E.; BRUNNER, G.D. A dramatic loss of cumulus cell gap junctions is correlated with germinal vesicle breakdown in rat oocyte. **Developmental Biology**, v.13, p.517-521, 1986.

MINGOTI, G.Z.; GARCIA, J.M.; ROSA-E-SILVA, A.A.M. Steriogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocyte-complexes matured in vitro with BSA and different concentrations of steroids. **Anim. Reprod. Scie.**, v.69, n.3-4, p.175-186, 2002.

SENBON SHOICHIRO; HARAO YUJI and MIYANO TAKASHI- Interactions between the Oocyte and surrounding somatic Cells in Follicular development:Lessons from In Vitro Culture. **Journal of Reproduction and Development**, Vol 49, no4,2003.

SUTTON M. L., GILCHRIST R. B., THOMPSON J.G. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Human Reproduction Update**,v.9, p.35-48.2003.

TAKAHASHI, M.; NAGAI, T.; HAMANO, S.; KUWAYAMA, M.; OKAMURA, N.; OKANO, A. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v.49, p.228-232, 1993.

ZAMBONI, L. Ultrastructure of mammalian oocytes and ova. **Biology of Reproduction**, v.2, p.44-63, 1970.

**Bolsa:** FAPESP