

RELAÇÃO DOS NÍVEIS DE PARAOXONASE 1 SANGUÍNEA COM A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE VACAS LEITEIRAS.

JOAO ALVEIRO ALVARADO RINCÓN^{1,4}; MARCIO ERPEN LIMA^{1,4}; SOFIA DEL CARMEN BONILLA DE SOUZA LEAL²; MARCIO NUNES CORRÊA^{3,4}; RUBENS ALVES PEREIRA⁴; AUGUSTO SCHNEIDER^{5,4}

¹Programa de Pós-graduação em Veterinária – UFPel – joaoal13@hotmail.com

²In Vitro Sul, Pelotas/RS

³Departamento de clínicas veterinária – UFPel

⁴Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC)
Faculdade de Veterinária – Universidade Federal de Pelotas – UFPel
Campus Universitário – 96010 900 – Pelotas/RS – Brasil
nupeec@ufpel.edu.br – www.ufpel.edu.br/nupeec

⁵Faculdade de Nutrição – UFPel – augustoschneider@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas biotécnicas reprodutivas na pecuária bovina tem permitido significativo aumento na produção leiteira. No entanto, a aspiração folicular (AF), produção *in vitro* de embriões (PIVE) e a transferência de embriões (TE) permitem multiplicar a descendência de fêmeas de alta qualidade genética de forma rápida e prática (ABADIA, 2006). Estas biotécnicas permitem o aumento do número de descendentes de animais de alto valor genético, redução do intervalo entre gerações e aumento na velocidade do melhoramento (ANDRADE et al., 2002). Um dos pontos críticos da PIVE é a seleção das doadoras, procurando-se fêmeas sem distúrbios reprodutivos, com ciclo estral regular, em adequado estado nutricional e em boas condições quanto ao bem-estar animal (REICHENBACH et al., 2002). A imprevisível resposta das doadoras à aspiração folicular e subsequente PIVE têm resultados variáveis tanto na qualidade dos oócitos, quanto na produção de embriões viáveis (PEIXOTO et al., 2002), no entanto a boa qualidade dos oócitos é requisito no sucesso destes programas reprodutivos (SENEDA et al., 2001). Folículos maiores contêm oócitos com maior potencial para tornarem-se blastocisto, quanto folículos menores precisam ser maturados antes de realizar a FIV (PAVLOK et al., 1992). Atividade metabólica normal em folículos ovarianos pode resultar em estresse oxidativo e danos aos oócitos (SCHNEIDER et al., 2013), além disso, condições como o balanço energético negativo (LUCY, 2008), estresse térmico (MOORE et al., 2005) dietas ricas em proteína e energia (BOLAND et al., 2001) entre outros, podem alterar a qualidade oocitária e subsequente produção de embriões viáveis.

O estudo dos metabolitos do sangue das fêmeas bovinas permite entender a relação entre os componentes sanguíneos e alguns dos eventos fisiológicos, permitindo identificar nos rebanhos características ou problemas particulares que podem afetar direta ou indiretamente a fertilidade e produtividade do sistema pecuário (RAMOS et al., 2007). A Paraoxonase 1 (PON1) forma parte da família de genes da enzima Paraoxonase, é sintetizada no fígado e transportada pelo sangue (FERRE, et al., 2002), esta encontra-se ligada à lipoproteína de alta densidade (HDL) que é a lipoproteína dominante no fluido folicular e é reconhecida por fornecer o colesterol para a esteroidogênese no folículo (SCHNEIDER et al., 2013). Estudos realizados com mulheres submetidas a fertilização *in vitro* têm indicado que a atividade de PON1 no folículo foi um preditor positivo de qualidade embrionária e do

número de células no dia da TE (BROWNE et al., 2008), além disso, SCHNEIDER et al. (2013) sugeriu que a atividade de PON1 no fluido folicular em bovinos é derivada da transferência a partir do sangue. Os resultados de BROWNE et al. (2008) indicam que a PON1 pode exercer efeitos protetores em geral, melhorando a competência do oócito; principalmente a nível do estresse oxidativo. Baseado nessas considerações o objetivo deste trabalho foi relacionar a atividade de paraoxonase sanguínea no momento da aspiração folicular com a produção de oócitos e embriões viáveis de vacas leiteiras.

2. METODOLOGIA

Este estudo foi conduzido em uma propriedade do município de Bagé, RS, onde foram utilizadas 18 fêmeas bovinas da raça Jersey, não lactantes, mantidas em pastejo de azevém (*Lolium multiflorum*) e trevo branco (*Trifolium repens*) com livre acesso a água e uma mistura mineral. As vacas foram submetidas a 3 seções de AF e PIVE, com intervalos de 14 dias entre cada seção. A primeira AF foi realizada com o objetivo de sincronizar a onda folicular dos animais para quando à segunda AF estiverem em semelhantes condições ovarianas. A coleta dos oócitos foi realizada mediante AF segundo descrito por IMAI et al. (2006), todos os folículos visíveis com diâmetro ≥ 2 mm foram aspirados utilizando ultrassom scanner B-mode (Aloka SSD 500, Tokyo, Japan) ligado a transdutor de 5.0 MHz convexo fixo a uma guia transvaginal. Os oócitos foram maturados, fertilizados e cultivados *in vitro* como descrito previamente (MATOBA et al., 2010).

No momento da AF foi coletado sangue do complexo arterio-venoso coccígeo em tubos vacutainer sem anticoagulante (BD Diagnostics, São Paulo, Brasil), os tubos foram centrifugados (a 2500 rpm por 15 min) e separado o soro em micro tubos armazenados a -70°C até avaliação. A atividade de PON1 foi avaliada mediante espectrofotometria no laboratório de nutrição experimental da UFPel.

Para a análise dos resultados foram dispostos dois grupos em relação à atividade de PON1 encontrada, grupo baixo (atividade de $\text{PON1} \leq 60$ U/L) e grupo alto (atividade de $\text{PON1} > 60$ U/L). A atividade de PON1 foi relacionada com o número total de folículos aspirados, oócitos recuperados, oócitos viáveis, taxa de clivagem e embriões viáveis para TE por doadora.

A análise estatística foi realizada usando o software Graphpad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) utilizando o teste de "t".

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade média de PON1 foi de 47.35 ± 11.90 U/L e 82.03 ± 19.19 U/L para o grupo baixo e alto respectivamente, estes valores são inferiores ao reportado por SCHNEIDER et al. (2013) em vacas da raça Holandês no período de transição, provavelmente porque estes animais encontravam-se em um desafio metabólico maior (Balanço energético negativo) que os animais deste estudo, além disso, não foram encontrados dados da atividade de PON1 na raça Jersey para efetuar sua comparação.

Os resultados das variáveis estudadas neste trabalho em relação aos grupos são apresentados na tabela 1, onde se observa que não houve diferença estatística entre grupos para as variáveis avaliadas, sugerindo a não associação entre os níveis de atividade de PON1 sanguínea com a produção de oócitos recuperados, oócitos viáveis e taxa de clivagem em protocolos de AF e PIVE em vacas Jersey, porém,

cabe salientar que para confirmar esses resultados é necessário realizar mais estudos com PON1 em bovinos e aumentar o número de animais avaliados.

Tabela 1. Repostas de vacas Jersey submetidas a aspiração folicular, fertilização e produção *in vitro* de embriões de acordo com a atividade de PON1.

Variáveis	Grupo baixo PON1	Grupo alto PON1	Valor de P
Nº Folículos aspirados	16.61±8.88	19.89±7.14	>0.05
Nº Oócitos recuperados	10.06±8.49	13.17±7.06	>0.05
Oócitos viáveis (%)	91± 20	86 ± 8	>0.05
Taxa de clivagem (%)	36 ± 20	35 ± 16	>0.05

± Desvio padrão

Em quanto á produção de embriões viáveis, os resultados deste estudo são semelhantes ao reportado por GONÇALVES et al. (2007), porém não foram diferentes entre grupos, sugerindo que a atividade de PON1 sanguínea não teve relação com a produção de embriões *in vitro*, contrario do exposto em alguns trabalhos com mulheres, que sugerem à atividade de PON1 sanguínea como preditor positivo tanto da qualidade oocitária quanto a do embrião em protocolos de PIVE (BROWNE et al., 2008), por isto, mais estudos serão conduzidos com o fim de validar estes resultados no modelo bovino.

4. CONCLUSÕES

Neste estudo, não houve relação entre o nível de atividade de PON1 sanguínea e a produção de embriões *in vitro* de vacas da raça Jersey submetidas à aspiração folicular.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIA, M.E. **Transferência de embriões em bovinos: revisão de literatura.** 2006. Monografia (Especialização em produção e reprodução em bovinos) – Curso de Pós-graduação em Produção e Reprodução em Bovinos, Universidade Castelo Branco.

ANDRADE, J.C.O.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F. Use steroid hormone treatments prior to superovulation in Nelore donors. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.69, n.1-2, p.9-14, 2002.

BOLAND M.P.; LONERGAN, P.; O'CALLAGHAN, D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. **Theriogenology**, Stoneham, v.55, p.1323–1340, 2001.

BROWNE, R.W.; SHELLY, W.B.; BLOOM, M.S., 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**, Oxford, v.23, n.8, p. 1884-1894, 2008.

FERRE, N.; CAMPS, J.; PRATS, E., et al. Serum paraoxonase activity: a new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage. **Clinical Chemistry**, Nova Iorque, v.48, p.261–268, 2002.

GONÇALVES, P.B.D.; BARRETA, M.H.; SANDRI, L.R., et al. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, p.212-217, 2007.

IMAI, K.M.; TAGAWA, H.; YOSHIOKA, S., et al. The efficiency of embryo production by ovum pick-up and in vitro fertilization in cattle. **The Journal of Reproduction and Development**, 52,p.19–29, 2006.

LUCY, M.C. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for postpartum nutrition and reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, Nova Iorque, v.43, n.2, p.31–39, 2008.

MATOKA, S.; FAIR, T.; LONERGAN, P. Maturation, fertilisation and culture of bovine oocytes and embryos in an individually identifiable manner: A tool for studying oocyte developmental competence. **Reproduction Fertility and Development**, Melbourne, v.22, p.839-851, 2010.

MOORE, C.E.; KAY, J.K.; COLLIER, R.J.; VANBAALE, M.J., et al. Effect of supplemental conjugated linoleic acids on heat-stressed Brown Swiss and Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Urbana, v.88, p.1732–1740, 2005.

PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocyte derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, Nova Iorque, v.31, p.63-67, 1992.

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

RAMOS, A.F.; NEVES, E.F.; MARQUES, V.S., et al. Efeito de diferentes protocolos de superovulação sobre a concentração plasmática de progesterona e de metabólitos lipídicos de vacas Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.59, n.2, p.273-279, 2007.

REICHENBACH, H.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F., et al. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. cap.8, p.127-177.

SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M. et al. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.67, p.37-43, 2001.

SCHNEIDER, A.; ABSALON-MEDINA, V.A.; ESPOSITO, G., et al. Paraoxonase (PON) 1, 2 and 3 expression in granulosa cells and pon1 activity in follicular fluid of dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, Nova Iorque, v. n/a, p. n/a, 2013.