

ADIÇÃO DE PARAOXONASE-1 DURANTE A MATURAÇÃO OVOCITÁRIA E SEU EFEITO SOBRE A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

JOAO A. A. RINCÓN^{1,2}; ELISÂNGELA M. MADEIRA¹; JANAINA F. DA SILVA³;
MARCIO N. CORRÊA²; LIGIA M. C. PEGORARO⁴; AUGUSTO SCHNEIDER^{5,2}

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

²Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC)-UFPel-
Campus Universitário – 96010 900 – Pelotas/RS – Brasil
nupeec@ufpel.edu.br – www.ufpel.edu.br/nupeec

³Programa de Graduação em Veterinária- UFPel-

⁴Embrapa Clima Temperado, Pelotas.

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

1. INTRODUÇÃO

O periparto é considerado um período crítico para definir o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras. Nesta fase as demandas de nutrientes aumentam muito em relação à ingestão de matéria seca, fazendo com que a vaca entre em balanço energético negativo (BEN) (BAUMAN; CURRIE, 1980). Entretanto, a intensidade e duração do BEN estão negativamente relacionadas com o desempenho reprodutivo. Desta maneira, vacas que apresentam um BEN mais severo têm um atraso no retorno da atividade ovariana e em consequência um atraso na concepção (BUTLER; SMITH, 1989).

O BEN é caracterizado por diversas alterações metabólicas, incluindo as relacionadas ao perfil lipídico (WATHES et al., 2007) e consequentemente da lipoproteína de alta densidade (HDL) e a paraoxonase-1 (PON1). A PON1 é uma enzima antioxidante, que circula no plasma exclusivamente ligada ao HDL, contribuindo com suas propriedades anti-inflamatórias e antiaterogênicas, ao prevenir o aumento da quantidade de espécies reativas de oxigênio, hidrolisar os peróxidos lipídicos e diminuir a suscetibilidade do HDL à peroxidação (SCHRADER; RIMBACH, 2011). Ela é caracterizada como uma proteína de fase aguda negativa, reduzindo seus níveis circulantes em resposta às citocinas liberadas durante a inflamação (BIONAZ et al., 2007). A resposta eficiente aos processos inflamatórios e a recuperação dos animais doentes está atrelada ao restabelecimento dos níveis normais da PON1 após o período de estresse (BOSSAERT et al., 2012). Observações prévias indicam uma correlação positiva entre os níveis séricos e intrafoliculares de HDL e PON1 em bovinos (SCHNEIDER et al., 2013), da mesma forma que observado em mulheres (BROWNE et al., 2008).

Em humanos, a maior atividade sérica e intrafolicular de PON1 está relacionada ao maior número de blastômeros no momento da transferência e maior qualidade do embrião (BROWNE et al., 2008), indicando que o HDL e principalmente a PON1 podem desempenhar um papel de proteção na saúde do oócito e no desenvolvimento embrionário inicial (FUJIMOTO et al., 2010). Sua ação é relacionada como antioxidante nas membranas celulares, o que pode melhorar a competência do ovócito, principalmente por reduzir o estresse oxidativo (BROWNE et al., 2008).

Através disso, é possível relacionarmos o estresse oxidativo e o fator protetor da PON1 à qualidade do oócito e ao desenvolvimento embrionário inicial. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de diferentes níveis de PON1 ao meio de maturação, durante a produção *in vitro* de embriões bovinos.

2. METODOLOGIA

Foram coletados ovários bovinos provenientes de abatedouros locais e transportados ao laboratório em solução salina a temperatura de 30°C. Os *complexos cúmulos ovócitos* (CCOs) foram recuperados mediante punção de folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm. Durante a punção, o líquido folicular juntamente com os CCOs foi mantido em banho-maria à 30°C e, finalmente permaneceu por 10 min para decantação. O sedimento (pellet) foi então transferido para placas de Petri, onde foi realizada a recuperação e seleção quanto à qualidade morfológica dos CCOs.

Foram dispostos 4 tratamentos de acordo com a adição de PON1 ao meio de maturação *in vitro* (MIV): $T_0 = 0,0 \text{ mg/mL}$, $T_1 = 0,02 \text{ mg/mL}$, $T_2 = 0,04 \text{ mg/mL}$ e $T_3 = 0,08 \text{ mg/mL}$ de PON1 recombinante (Chesapeake PERL Inc., Savage, EUA). Os CCOs previamente selecionados foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 50 por tratamento, e colocados em gotas de 400 μL de meio MIV suplementado com PON1. Desta maneira foram realizadas 8 repetições totalizando 1600 COCs.

Os meios de MIV, FIV, CIV e o soro fetal bovino foram cedidos gentilmente pela Biotecnologia Animal® (Brasília, DF, Brasil).

A MIV ocorreu em estufa com 5% de CO_2 e 39 °C por 24hs. Para análise da atividade da PON1 foram coletados 15 μL do meio às 0 e 24hs de maturação. Após a maturação, os oócitos foram lavados e transferidos para gotas de 400 μL do meio de Fecundação *in vitro* (FIV). Para a inseminação foram utilizadas palhetas da mesma partida de sêmen *Bos taurus taurus*. Após a seleção espermática, com a utilização do mini gradiente de Percoll, foi realizada inseminação com concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL. Após a inseminação (D0), os oócitos foram incubados com os espermatozoides por 20hs, nas mesmas condições da MIV.

Após a fecundação, as estruturas foram transferidas para o meio de manipulação, para remoção das células do *cumulus oophorus* mediante pipetagem. As estruturas recuperadas foram lavadas três vezes e transferidas para o meio de cultivo acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado. Os presumíveis zigotos foram cultivados em gotas de 200 μL , sob óleo mineral nas mesmas condições que a MIV. Após 48h do início da FIV (D2), foi realizada a avaliação da clivagem (clivados/inseminados) e ao sétimo dia (D7) as taxas de desenvolvimento embrionário (número de blastocistos/número de inseminados).

Para determinação da atividade PON1 foi utilizado um tampão Tris/HCl 20 mM, cloreto de cálcio 1 mM e fenilacetato 4mM para preparo da solução de trabalho. As amostras foram diluídas (1:3) em Tampão 20mM Tris/HCl. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, adicionando-se 3,3 μL da amostra diluída e 500 μL da solução de trabalho. O comprimento de onda utilizado foi de 270 nm e um tempo de leitura de 1 minuto. A atividade da enzima foi determinada pela seguinte fórmula: $\Delta \text{Absorbância} \times 115 \times 3$.

A análise estatística foi realizada através do procedimento GLM no programa SAS (SAS, Cary, NC, EUA) para o teste do efeito linear, quadrático e cúbico da adição de doses crescentes de PON1 no meio de MIV sobre a atividade da enzima, taxa de clivagem e produção de embriões.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade média de PON1 no meio de MIV foi de $2,1 \pm 2$; $15,2 \pm 2$; $28,5 \pm 2$ e $52,4 \pm 2$ U/mL para T_0 , T_1 , T_2 e T_3 , respectivamente. Não houve diferença nas taxas de clivagem (81,7%, 85,1%, 81,0%, 82,5%; para o T_0 , T_1 , T_2 e T_3 , respectivamente). No entanto, a adição de PON1 no meio de MIV melhorou o desenvolvimento embrionário de maneira linear ($P < 0,0001$), resultando na produção de embriões em D7 de 22,1% (T_0), 29,2% (T_1), 32,6% (T_2) e 34,4% (T_3), conforme a figura 1. Além disso, este efeito foi suportado pela correlação positiva entre o nível de PON1 no meio de MIV e a taxa de blastocisto no D7 ($r = 0.35$, $P = 0.04$).

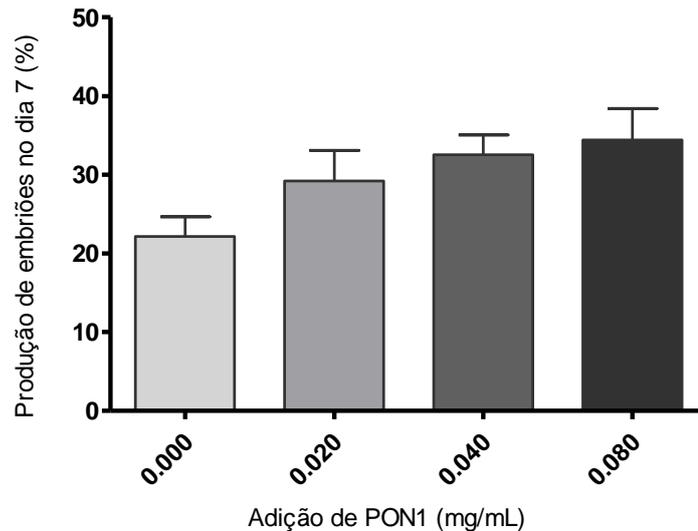


Figura 1. Produção *in vitro* de embriões bovinos no D7 com adição de diferentes níveis de PON1.

Esses resultados concordam com o exposto por BROWNE et al. (2008) que em mulheres encontrou relação positiva entre a atividade de PON1 intrafolicular e o desenvolvimento embrionário, sugerindo que o nível de PON1 a que o oócito é exposto tem potencial de proteger suas membranas do estresse oxidativo gerado no meio e ser fundamental na determinação da fertilidade *in vivo*, tanto em humanos quanto em animais domésticos.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que a adição de PON1 no meio de MIV tem um efeito positivo na produção *in vitro* de embriões bovinos, sugerindo que a PON promove uma melhor maturação ovocitária.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUMAN, D.E.; CURRIE, W.B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science*, Urbana, v.63, p.1514-1529, 1980.

BIONAZ, M.; TREVISI, E.; CALAMARI, L.; LIBRANDI, F.; FERRARI, A.; BERTONI, G. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in

transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Urbana, v.90, p.1740-1750, 2007.

BOSSAERT, P.; TREVISI, E.; OPSOMER, G.; BERTONI, G.; VLIEGHER, S.; LEROY, J.L. The association between indicators of inflammation and liver variables during the transition period in high-yielding dairy cows: an observational study. **The Veterinary Journal**, v.192, p.222-225, 2012.

BROWNE, R.W.; SHELLY, W.B.; BLOOM, M.S.; OCQUE, A.J.; SANDLER, J.R.; HUDDLESTON, H.G.; FUJIMOTO, V.Y. 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, p.1884-1894, 2008.

BUTLER, W.R.; SMITH, R.D. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Urbana, v.72, p.767-783, 1989.

SCHNEIDER, A.; ABSALON-MEDINA, V.; ESPOSITO, G.; CORREA, M.; BUTLER, W. 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.

SCHRADER, C.; RIMBACH, G. Determinants of paraoxonase 1 status: genes, drugs and nutrition. **Current Medicinal Chemistry**, v.18, p.5624-5643, 2011.

WATHES, D.C.; FENWICK, M.; CHENG, Z.; BOURNE, N.; LLEWELLYN, S.; MORRIS, D.G.; KENNY, D.; MURPHY, J.; FITZPATRICK, R. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. **Theriogenology**, Stoneham, v.68, Supl 1, p.232-241, 2007.