

EFEITO DO BLOQUEIO MEIÓTICO SOBRE A MATURAÇÃO E FERTILIZAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS

RESUMO

As biotecnologias da reprodução são cada vez mais utilizadas com o objetivo de aumentar a oferta de material genético assim como preservação de germoplasma. A oferta de oócitos viáveis no estágio adequado para sua utilização é fundamental para o sucesso na produção *in vitro* de embriões. Uma alternativa seria evitar a retomada prematura da meiose após a remoção dos oócitos do ambiente folicular induzindo um bloqueio meiótico com o intuito de fornecer ao oócito mais tempo para que o mesmo possa sofrer modificações necessárias para suportar a fertilização e ter desenvolvimento embrionário normal. Inibidores, como o Rolipram, tem sido utilizado com esse intuito. Estes bloqueadores podem possivelmente melhorar a competência oocitária através de uma melhor maturação citoplasmática. O objetivo desse projeto foi avaliar o efeito do rolipram durante a maturação de oócitos bovinos na quantidade e qualidade de embriões produzidos *in vitro*. Para tanto, ovários foram coletados em abatedouro e transportados para o Laboratório de Reprodução Animal- LABRAPE da UFRPE/UAG. Os complexos cúmulos oócitos CCOs foram selecionados e divididos em 5 grupos: 1 Controle 0 hora: oócitos fixados e corados logo após a seleção para observarmos o status pós-coleta; Controle A: maturação por 24 horas na ausência de Rolipram; Rolipram 3 tratamentos: bloqueio da maturação por 24 horas em meio de maturação contendo (100, 150 e 200 μM). Após a maturação, uma parte dos oócitos dos grupos tratamentos e o grupo controle foram colocados em meio de maturação base por mais 24 horas para observar a reversão do bloqueio. Estes oócitos foram avaliados em microscópio equipado com epifluorescência. Após a maturação, o restante dos oócitos do grupo Controle e os tratamentos com Rolipram foram fecundados *in vitro* para avaliação das taxas de clivagem 48 horas pós fecundação e de blastocisto no D7 pós fecundação. Além disso, parte dos oócitos foram desnudados e armazenados para avaliação de expressão dos seguintes genes: Mater, BMP15, BAX, para observação do efeito do bloqueador na expressão desses genes nos embriões. Dos oócitos avaliados logo após a aspiração folicular, 79,00% encontravam-se em VG, QVGBD, ou MI, caracterizando-se como imaturos enquanto 13,40%, encontrava-se em MII e 7,60%, considerados degenerados ou não identificados. Nas diferentes concentrações de T100, T150 e T200 μM foram observadas diferenças em oócitos que atingiram a fase de MII comparando os tratamentos com o controle ($P = 0,003$). Quanto ao desenvolvimento embrionário houve diferenças na taxa de clivagem ($P < 0,05$) entre T150 e T200 quando comparados ao grupo C/24 e a taxa de blastocisto obteve diferença ($P < 0,001$) entre os tratamentos comparados ao grupo controle, sendo T100 μM a concentração que proporcionou menos efeitos negativos como diminuição da taxa de clivagem e blastocisto durante a pré-maturação de oócitos bovinos.

Palavras chave: Ruminantes, FIV, Rolipram, Maturação nuclear, Maturação citoplasmática.

ABSTRACT

Biotechnology of reproduction has been increasingly used in order to improve genetic material as well as germplasm preservation. Provision of viable oocytes in stage suitable for its use is essential to the success of this technique. An alternative would be to prevent resumption of meiosis after removal of oocytes from follicular environment inducing a meiotic blockage with the aim of providing the oocyte more time available so that it could be possible to suffer modifications required to support fertilization and normal embryonic development. Inhibitors, as Rolipram has been used with this objective. These blockers can improve oocyte competence through a better cytoplasmatic maturation. The goal of this project was to evaluate the effect of rolipram during maturation of bovine oocytes on quantity and quality of embryos produced *in vitro*. Ovaries was collected at slaughter and transported to the laboratory of Animal Reproduction at UAG/UFRPE - LABRAPE. The COC's were selected and divided into 5 groups: Control 1 (time 0): oocytes fixed and stained immediately after selection to observe after collection status; control: in vitro maturation for 24 hours in the absence of Rolipram; Rolipram in 3 different treatments: blockage for 24 hours in maturation medium containing (100, 150 and 200 μ M). After 24 hours, treatment and control groups were placed in maturation medium for over 24 hours to observe the reversal of the blockage. These oocytes were evaluated using an epifluorescent microscope to check maturation stage. After maturation, oocytes from control (within 24 hours of in vitro maturation) and treatments groups with Rolipram were in vitro fertilized 48 hours post fertilization to assess cleavage and blastocyst formation at D7 post fertilization. In addition, part of the oocytes were stored for expression of the following genes: Mater, BMP15, BAX to observe the effect of the blocker on expression of these genes in the embryos. The oocytes evaluated immediately after follicular aspiration 79.00% were in VG, QVGBD, or MI, characterized as immature and 13.40%, was in MII and 7.60%, were considered degenerate or not identified. In different concentrations of T100 and T200 T150 μ M, we observed significant differences in oocytes that have reached the MII phase comparing with control treatments ($P = 0.003$). As for the embryonic development, differences in the rate of cleavage ($P < 0.05$) were observed between T150 and T200 when compared to Control 24 hour Group. A difference was seen on blastocyst rate ($P < 0.001$) among the treatments compared to control group, being T100 μ M the concentration which provided less negative effects during pre-maturing of bovine oocytes.

Key words: Bovine, IVF, Oocyte nuclear maturation, Rolipram, Cytoplasmic maturation.

Site: <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede2/handle/tede2/8037>