

Resumo

RINCÓN, Joao Alveiro Alvarado. **Adição de paraoxonase-1 durante a maturação oocitária e seu efeito sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos.** 2015. 34f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Estudos sugerem que a enzima paraoxonase-1 (PON1) pode exercer efeito antioxidante nas membranas celulares, o que poderia melhorar a competência do oócito, principalmente por reduzir o estresse oxidativo. Baseado nisso, objetivou-se avaliar o efeito da adição de diferentes níveis de PON1 recombinante humana (rPON1) ao meio de maturação (MIV), sobre os índices de desenvolvimento embrionário e expressão gênica em oócitos e embriões bovinos. Em 8 repetições, 1600 *complexos cumulus oócitos* (COCs) foram coletados de ovários bovinos provenientes de abatedouros locais e divididos aleatoriamente em quatro grupos de 50 COCs: 0,0; 0,02; 0,04 e 0,08mg/mL de rPON1 no meio de MIV. A maturação ocorreu em estufa com 5% de CO₂ e 39 °C durante 24 horas. Após a seleção espermática, com a utilização do mini percoll[®], foi procedida a fecundação (FIV) com concentração de 1x10⁶ espermatozóides/mL. Decorridas 18 horas os prováveis zigotos foram cultivados durante 7 dias no meio de cultivo adicionado de 10% de SFB em condições controladas (5% CO₂, 5% O₂ e 90%N₂) à 39°C. Foram coletados oócitos desnudos e células do *cumulus* (600 COCs, 3 repetições) e embriões D7 (8 repetições) para extração de RNA e análise da expressão gênica (Bax, Bcl-2 e MnSOD). A atividade de PON1 foi avaliada às 0 e 24hs de maturação mediante espectrofotometria. A atividade média de PON1 no meio de MIV foi de 2,15±0,38; 15,51±1,48; 30,24±2,96 e 57,94±5,03 U/mL de acordo à adição de rPON1 ao meio de MIV (0; 0,02; 0,04 e 0,08 mg/mL respectivamente). Não houve diferença (P>0,05) nas taxas de clivagem: 81,7%, 85,1%, 81,0%, 82,5% respectivamente. No entanto, a adição de rPON1 no meio de MIV melhorou o desenvolvimento embrionário de maneira linear (P<0,0001) de acordo com a quantidade de proteína adicionada, resultando na produção de embriões em D7 de 22,1%; 29,2%; 31,7% e 33,8% respectivamente. Além disso, este efeito foi suportado pela correlação positiva entre o nível de rPON1 no meio de MIV e a taxa de blastocisto no D7 (r=0,35; P=0,04). Não foi observada diferença na expressão dos genes avaliados nos oócitos, células do *cumulus* e embriões. Conclui-se que a adição de rPON1 no meio de MIV tem um efeito positivo na PIV de embriões bovinos, indicando que a PON1 promove uma melhor taxa de desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: antioxidante; bovino; expressão gênica.

Abstract

RINCÓN, Joao Alveiro Alvarado. **Effects of the addition of paraoxonase-1 during oocyte maturation on the in vitro production of bovine embryos.** 2015. 34f. Dissertation (master) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Some studies suggest that the enzyme paraoxonase-1 (PON1) can exert antioxidant effects on cell membranes, thereby improving the competence of the oocyte, particularly by reducing oxidative stress. Based on this, the aim of the current study was to evaluate the effect of different levels of human recombinant PON1 (rPON1) in the maturation medium, on embryo development and gene expression in bovine oocytes and embryos. The study was performed in 8 repetitions, using 1600 *cumulus* oocyte complexes (COCs) collected from bovine ovaries at local slaughterhouses and divided randomly into four groups of 50 COCs each containing 0.0; 0.02; 0.04 and 0.08 mg/mL rPON1 in the IVM medium. Maturation occurred in the incubator at 5% CO₂ and 39 °C for 24 hours. After the sperm selection using the mini Percoll[®], IVF was performed with a sperm concentration of 1x10⁶/ml. After 18 hours, presumptive zygotes were cultured for 7 days using IVC medium with the addition of 10% FBS under controlled conditions (5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂) at 39 °C. In addition, denuded oocytes and *cumulus* cells (600 COCs, 3 repetitions) and D7 embryos (8 repetitions) were collected for RNA extraction and gene expression analysis (Bax, Bcl-2 and MnSOD). PON1 activity was evaluated at 0 and 24 hours of maturation by spectrophotometry. The average PON1 activity in the IVM medium was 2.15±0.38; 15.51±1.48; 30.24±2.96 and 57.94±5.03 U/mL according to the addition of 0.0; 0.02; 0.04 and 0.08 mg/mL of rPON1 in the IVM medium. There was no difference (P>0.05) in cleavage rates among treatments: 81.7%; 85.1%;

81.0%. 82.5% respectively. However, the addition of rPON1 to the IVM medium improved embryo development linearly ($P < 0.0001$), resulting in D7 embryo production of 22.1%, 29.2%, 31.7% and 33.8%, respectively. Moreover, this effect was supported by the positive correlation between the level rPON1 in the IVM medium and the D7 blastocyst rate ($r = 0.35$; $P = 0.04$). There was no difference in gene expression in oocytes, cumulus cells and embryos. Finally, the addition of rPON1 in the IVM medium had a positive effect on the IVP of bovine embryos, indicating that PON1 improves embryo rate.

Keywords: antioxidant; bovine; gene expression.