

Efeito do Antioxidante Alfa-Tocoferol na Taxa de Maturação de Ovócitos Bovinos

Dissertação de mestrado

Lóide Isabel Simões Soares Valadão

Mestrado em

Engenharia Zootécnica



Efeito do Antioxidante Alfa-Tocoferol na Taxa de Maturação de Ovócitos Bovinos

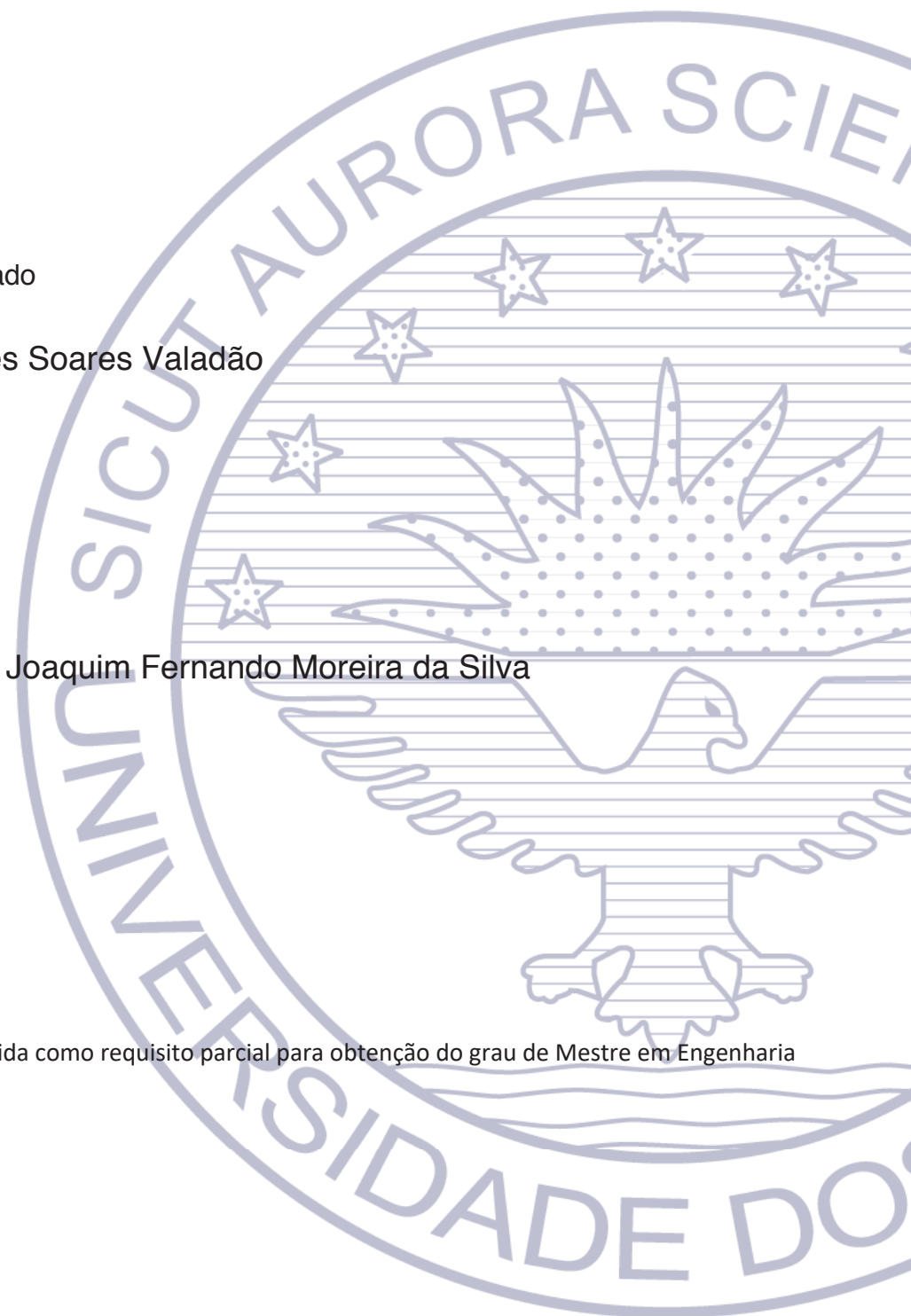
Dissertação de Mestrado

Lóide Isabel Simões Soares Valadão

Orientador

Professor Doutor Joaquim Fernando Moreira da Silva

Tese de Mestrado submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Zootécnica



Declaro ser a autora desta dissertação, que constitui um trabalho original, que nunca foi submetido (no seu todo ou qualquer das suas partes) a outra instituição de ensino superior para obtenção de grau académico ou outra habilitação. Atesto ainda que todas as citações estão devidamente identificadas.

Mais acrescento que tenho consciência de que o plágio – utilização de elementos alheios sem referência ao seu autor – constitui uma grave falta de ética, que poderá resultar na anulação da presente dissertação.

Agradecimentos

Ao meu marido Rui e à minha filha Constança pela força e apoio incondicional na concretização deste projeto. Obrigada por tudo!

À minha mãe e à minha irmã pelos seus conselhos e força ao longo desta etapa. Obrigada por tudo!

À Doutora Helena Silva pela sua ajuda, pelos seus ensinamentos e profissionalismo partilhados comigo, à qual agradeço eternamente!

Ao Professor Doutor Joaquim Fernando Moreira da Silva, agradeço muito a simpatia, a paciência, o apoio, a partilha de experiências e a confiança tornando assim possível o fim deste trabalho com gratificação. O meu Muito Obrigada!

Resumo

A produção *in vitro* de embriões é uma técnica com fins experimentais que é também utilizada como ferramenta de campo, para o melhoramento reprodutivo e genético das explorações.

O presente trabalho foi delineado para avaliar o efeito do antioxidante Alfa-Tocoferol na taxa de maturação de ovócitos bovinos. Para tal, foram recolhidos no Matadouro do IAMA da Ilha Terceira, um total de 194 ovários transportados para o laboratório em solução salina, sendo processados no máximo 2 horas após o abate. Foram feitas no total 12 manipulações. Os folículos de 2 a 8mm de diâmetro, foram puncionados tendo sido conseguidos um total de 779 complexos de cumulus – ovocitários (COCs) considerados de qualidade 1 e 2 de acordo com o seu aspeto morfológico. Estes COCs foram divididos em 4 grupos, tendo sido cultivados em meio de maturação suplementado com diferentes concentrações (0; 0,5; 1 e 2mM) de Alfa-Tocoferol durante 24h a 38,5°C, com 5% de CO₂ no ar e saturada de humidade. Após este período, os COCs foram transferidos para tubos cónicos de 15mL devidamente identificados que continham 2-3mL de meio de lavagem. Posteriormente, as células do *cumulus* foram removidas, os ovócitos foram corados com aceto-orceína e observados ao microscópio de contraste de fase, procedendo-se à avaliação das diferentes fases nucleares nas diferentes concentrações de α -Tocoferol. Os resultados da maturação *in vitro* foram expressos em percentagem.

O antioxidante α -Tocoferol numa concentração de 0,5mM fez aumentar significativamente ($P < 0.05$) a taxa de maturação, relativamente ao grupo de controlo, tendo os resultados sido, respetivamente de 60,87 vs 68,00. Para as outras duas concentrações, não foram observadas diferenças significativas quando comparados com

os resultados obtidos no grupo de controlo, tendo a taxa de maturação sido respetivamente de 64,29 e de 60,61, respetivamente para as concentrações de 1 e 2mM de α -Tocoferol.

Este estudo sugere-nos que adição do antioxidante α -Tocoferol na concentração de 0,5mM aumenta a Taxa de Maturação dos ovócitos da espécie bovina. Futuramente, seria importante complementar este estudo com a realização de trabalhos sobre o efeito deste antioxidante sobre a taxa de produção *in vitro* de embriões, bem como a suplementação da alimentação das fêmeas bovinas com Vitamina E.

Palavras chave: Espécies reativas de oxigénio, antioxidante, α -Tocoferol, meiose e maturação *in vitro*

Abstract

The in vitro production of embryos is a technique with experimental purposes that is also used as a field tool for the breeding and genetic improvement of the farms.

The present work was designed to evaluate the effect of the antioxidant Alpha-Tocopherol on the maturation rate of bovine oocytes. For this purpose, a total of 194 ovaries transported to the laboratory in saline were collected at the IAMA Slaughterhouse in Terceira Island, being processed no more than 2 hours after slaughter. A total of 12 manipulations were made. The follicles 2 to 8 mm in diameter were punctured and a total of 779 cumulus - oocyte complexes (COCs) were obtained, considered of quality 1 and 2 according to their morphological aspect. These COCs were divided into 4 groups and grown in maturation medium supplemented with different concentrations (0, 0.5, 1 and 2 mM) of alpha-Tocopherol for 24 h at 38.5 ° C, with 5% CO₂ in the air and saturated with moisture. After this period, the COCs were transferred to properly identified 15mL conical tubes containing 2-3mL of wash medium. Subsequently, the cumulus cells were removed, the oocytes were stained with aceto-orcein and observed under the phase contrast microscope, and the different nuclear phases were evaluated at the different α -Tocopherol concentrations. In vitro maturation results were expressed as a percentage.

The α -Tocopherol antioxidant at a concentration of 0.5mM increased significantly (P <0.05) the maturation rate, relative to the control group, with the results being respectively 60.87 vs 68.00. For the other two concentrations, no significant differences were observed when compared to the results obtained in the control group, the maturation rate being respectively 64.29 and 60.61, respectively for the concentrations of 1 and 2mM α -Tocopherol.

This study suggests that addition of the antioxidant α -Tocopherol at the concentration of 0.5mM increases the Maturation Rate of oocytes of the bovine species.

In the future, it would be important to complement this study with the work carried out on the effect of this antioxidant on the rate of in vitro production of embryos, as well as the supplementation of the feeding of the bovine females with Vitamin E.

Índice

CAPÍTULO I	1
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO II	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1. RADICAIS LIVRES	4
1.1 Definição	4
1.2 História	4
1.3 Espécies reativas de oxigênio	5
1.4 Stress Oxidativo	6
1.5 Efeitos do stress oxidativo	7
2. ANTIOXIDANTES	8
2.1 Definição	8
2.2 Mecanismos de ação dos antioxidantes	8
2.2 Categorização dos antioxidantes	10
3. VITAMINA E - ALFA-TOCOFEROL	12
3.1 História	12
3.2 Família da vitamina E: Metabolismo e propriedades biológicas	12
3.3 Fontes de vitamina E	14
3.4 Vitamina E e os ruminantes	15
4. TÉCNICA DE FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i> (FIV)	15
4.1 Definição	15
4.2 Noções básicas	15
5. MORFOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR DA VACA	16
5.1 Ovários	17
5.2 Folículo	17
5.4 Oviduto	20
5.5 Útero	20
5.6 Vagina	21
5.7 Vulva	21
6. CICLO ÉSTRICO	21
6.1. Ciclo ovário	22
6.2 Crescimento dos ovócitos	28
6.3 Morfologia das células do cumulus-oophorus	29
7. MATURAÇÃO DOS OVÓCITOS	31
7.1 Maturação nuclear	32
7.2 MATURAÇÃO CITOPLASMÁTICA	35
7.3. MATURAÇÃO MOLECULAR	39
8. MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i>	39
CAPÍTULO III	43
MATERIAIS E MÉTODOS	43
1. QUÍMICOS	ERRO! MARCADOR NÃO DEFINIDO.
1.1 Preparação dos meios	43
1.2 Recolha de ovários	44
1.3 Punção folicular	44
1.4 Avaliação da qualidade dos COCs	44
1.5 Maturação dos ovócitos e coloração nuclear	45
2. AVALIAÇÃO DOS DIFERENTES EVENTOS NUCLEARES REFERENTES ÀS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ALFA-TOCOFEROL	46

3. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS	ERRO! MARCADOR NÃO DEFINIDO.
CAPÍTULO IV.....	47
RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
CAPÍTULO IV.....	53
CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

Lista de abreviaturas

- AMPc – Monofosfato cíclico de adenosina
- AI – Anafase I
- Ca²⁺ - Ião cálcio
- CG – Complexo de Golgi
- CGPs – Células germinativas primordiais
- CIV – Cultivo *in vitro* de embriões
- CL – Corpo lúteo
- COCs – Complexo *cumulus - oophorus*
- DNA – Ácido desoxirribunocléico
- EDRF – Fator de relaxamento do endotélio
- EGF – Fator de crescimento epidermal
- FIV – Fecundação *in vitro*
- FSH – Hormona folículo estimulante
- GC – Grânulos corticais
- GnRH – Hormona libertadora de gonatrofina
- GPx – Enzima glutaciona peroxidase
- GSH – Glutaciona reduzida
- GVBD – Rompimento da vesícula germinativa
- H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio
- LH – Hormona luteinizante
- MI - Metafase I
- MII – Metafase II
- MIV – Maturação *in vitro*
- MnSOD – Superóxido dismutase dependente do manganês
- MPF – Fator promotor da maturação
- mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
- NADPH – Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NO – Óxido nítrico
- O₂⁻ - Anião superóxido
- O₂ – Oxigénio

OH[•] - Radical hidroxilo

PII – Profase

PGCs – Células germinativas primordiais

PIV – Produção *in vitro* de embriões

RE – Retículo endoplasmático

RNA – Ácido ribonucleico

rRNA – Ácido ribonucleico ribossómico

RNS – Espécies reativas de azoto

ROS – Espécies reativas de oxigénio

RSS – Espécies reativas de enxofre

SOD - Superóxido dismutase

TI – Telofase I

CAPÍTULO I

Introdução

A produção *in vitro* de embriões (PIV) compreende várias etapas como, a recuperação, maturação e fertilização dos ovócitos *in vitro* (FIV) bem como o posterior cultivo de embriões *in vitro* (CIV) até às fases de mórula e de blastocisto, por um período de aproximadamente 7-9 dias. Após este estado de desenvolvimento, os embriões produzidos poderão ser transferidos para recetoras ou criopreservados, sendo mais tarde usados para transferência, ou eventualmente usados para fins científicos. No decorrer da maturação os ovócitos passam por diversas alterações nucleares e citoplasmáticas. Dos eventos nucleares destacam-se a quebra da vesícula germinativa, o desaparecimento do nucléolo, a condensação da cromatina, a extrusão do 1º corpúsculo polar e formação do 2º fuso meiótico. De acordo com Gottardi e Mingoti (2009), os eventos citoplasmáticos incluem a síntese de proteínas, modificações moleculares, redistribuição dos organelos intracelulares e maturação dos mecanismos de libertação de Ca^{2+} .

Apesar da FIV ser já uma prática comum em alguns países quer como prática de maior aproveitamento do potencial genético de um determinado animal, quer como prática de testagem da capacidade fecundante de touros utilizados na inseminação artificial. A maturação dos ovócitos bem como o desenvolvimento inicial dos embriões continuam a ser os passos mais limitativos de todo o processo. Sabe-se que o stress oxidativo faz variar a eficiência da PIV de embriões podendo causar alterações negativas nos processos de maturação e de fecundação dos ovócitos e também no cultivo de embriões, a estratégia de otimização das taxas de maturação passa por adicionar ao meio

de maturação antioxidantes, os quais visam reduzir a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) (Trindade *et al.*, 2016).

Durante o metabolismo celular são originadas as ROS, sendo a produção destas substâncias maximizada em condições *in vitro*, pela presença de elevadas quantidades de oxigénio. Nos gâmetas e nos embriões os efeitos nocivos das ROS envolvem peroxidação dos lípidos das membranas, danos no DNA e morte celular por apoptose ou necrose (Silva e Gonçalves, 2010). Para colmatar o efeito negativo das ROS, as células possuem um mecanismo de defesa que pode atuar em duas vertentes. Numa delas retira as substâncias potencialmente tóxicas que podem causar lesões. Por outro lado, têm como função reparar as lesões ocorridas (Trindade *et al.*, 2016).

De acordo com Halliwell (2011) um antioxidante é uma molécula que protege um alvo biológico contra danos oxidativos. Os antioxidantes que representam a defesa dos organismos contra as espécies reativas são classificados como enzimáticos e não enzimáticos: os enzimáticos neutralizam o excesso de ROS e impedem que estes danifiquem a estrutura celular. Os não enzimáticos estão subdivididos naqueles endogenamente produzidos ou aqueles que são consumidos através de alimentos ou suplementos (Khazaei & Aghaz, 2017). A vitamina E é um conjunto de tocoferóis, sendo o mais importante como agente antioxidante, o alfa-tocoferol. Como é solúvel em gordura (lipossolúvel), atua protegendo as membranas celulares (formadas por lipídios) da ação dos radicais livres. Também protege as lipoproteínas de baixa densidade que atuam no transporte do colesterol. A forma bioativa da vitamina E é o α -Tocoferol e é designado, segundo Mock *et al.*, 2017 como o antioxidante mais potente encontrado na membrana celular capaz de inibir a propagação da peroxidação lipídica. Esta molécula é encontrada em quantidade substancial no ovário, no fluido folicular, sendo considerado um componente vital da fisiologia do ovário normal (Trindade *et al.*, 2016).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar, o efeito de diferentes concentrações do antioxidante α -Tocoferol no desenvolvimento meiótico durante a maturação *in vitro* de ovócitos bovinos.