

EFEITO DA PGE₂ E DA INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE PROSTAGLANDINAS NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO BOVINO *IN VITRO*.

EFFECT OF PGE₂ AND PROSTAGLANDIN SYNTHESIS INHIBITION ON BOVINE *IN VITRO* EMBRYO DEVELOPMENT

R.M. Pereira, C.C. Marques, M.C. Baptista; M.I. Vasques e A.E.M. Horta.
Estação Zootécnica Nacional - INIA, Departamento de Fisiologia e Reprodução Animal,
2000 Vale de Santarém. dfra.ezn@mail.telepac.pt

RESUMO

Pretendeu-se testar a influência da PGE₂ ou da ausência de prostaglandinas (PG) no desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* em co-cultura com monocamadas de células da granulosa. A PGE₂ ($1,4 \times 10^{-7}$ M) e a indometacina (28 μ M) foram adicionadas ao meio de cultura utilizado para refrescar células e embriões. Vinte e duas horas após a inseminação, os oócitos foram divididos em 3 grupos (Testemunha, n=461; Indometacina, n=452; PGE₂, n=465; 10 réplicas) e colocados nas monocamadas, prosseguindo o seu desenvolvimento até aos 12-13 dias de idade.

Os resultados mostram que a PGE₂ aumenta a taxa de clivagem em 6% (P=0,04) e a qualidade dos embriões em D8, em relação à testemunha. O grupo PGE₂ apresenta uma diminuição da taxa de embriões entre D7 e D8, parecendo haver nestes dias uma interferência negativa desta PG na transição de jovem blastócito para blastócito. Embora a indometacina não afecte significativamente a taxa de clivagem, neste grupo, a taxa de embriões em D7 é inferior à do grupo PGE₂ (34 vs. 42,4%, P=0,03) e, em D8, à do grupo testemunha (33,1 vs. 39,9%, P=0,07). A indometacina prejudica a qualidade dos embriões em D8, com significativamente menos embriões de grau 1 que os grupos testemunha e PGE₂ (P=0,007 e P=0,005) e, mais de grau 4 que o grupo PGE₂ (P=0,001). Prejudica também a taxa de embriões extrusados em relação à testemunha e ao grupo PGE₂ (53,21 vs. 74,02% 78,03% para P=0,001 e P<0,001). A indometacina interfere ainda na dinâmica do desenvolvimento embrionário, tendendo os embriões deste grupo a estarem atrasados em relação aos outros, sobretudo devido à acção negativa deste inibidor na eclosão dos embriões da zona pelúcida.

Os efeitos prejudiciais induzidos pelo bloqueio da síntese de prostaglandinas apontam para a importância destas hormonas nos diferentes estádios do desenvolvimento embrionário precoce. A PGE₂ beneficia a clivagem e o desenvolvimento dos embriões até D7. Esta prostaglandina parece anular o efeito negativo da blastulação precoce característica dos embriões produzidos *in vitro*, atrasando a transição do estadio de mórula para blastócito em D7 e D8. Este atraso aparece associado a uma melhoria significativa da qualidade dos embriões.

SUMMARY

It was evaluated the effect of PGE₂ supplementation or PG inhibition on bovine *in vitro* embryo development in a granulosa cell monolayers co-culture system. PGE₂ ($1,4 \times 10^{-7}$ M) or indomethacin (28 μ M) were added to culture medium used to refresh embryos and granulosa cells. Twenty two hours after *in vitro* insemination, ova were randomly allotted into three groups (Control, n=461; Indomethacin, n=452; PGE₂, n=465; 10 trials) and transferred to granulosa cell monolayers until day 12 or 13 of embryo development.

Results show that PGE₂ improved 6% in cleavage rate (P=0,004) and also embryo quality at day 8 (D8), when compared to Control. Embryo production rate decreased from D7 to D8 in PGE₂ group, suggesting that at this stage PGE₂ negatively affects embryo growth from young blastocyst to blastocyst. Indomethacin had no significant effect on cleavage rate, but embryo rate in this group is lower than in PGE₂ at D7 (34 vs. 42,2%, P=0,03) and lower than in Control at D8 (33,1 vs. 39,9%, P=0,07). Indomethacin had a

detrimental effect on embryo quality at D8, as significantly less grade 1 embryos than in Control and PGE₂ groups (P=0,007 and P=0,005) and more grade 4 embryos than in group PGE₂ were produced (P=0,001). Indomethacin had also a detrimental effect on hatched embryo rate when compared to Control and PGE₂ groups (53,21 vs. 74,02% and 78,03%, P=0,001 and P<0,001). Embryos produced in Indomethacin group are prone to be retarded when compared to embryos from other groups, due to its negative effect on the mechanism of embryo hatching.

Detrimental effects induced by prostaglandin synthesis inhibition indicate that these hormones play an important role in all stages of embryo development. PGE₂ improves cleavage and embryo development until day 7 and delays embryo growth from morula to blastocyst stage. The usually accelerated transition from morula to blastocyst affecting embryo viability could benefit of this PGE₂ effect associated to a significant improvement in embryo quality.

INTRODUÇÃO

As condições de cultura dos estádios precoces do desenvolvimento embrionário bovino ainda não estão optimizadas (Bavister, 1995; Kruij *et al.*, 2000). A incorporação do ácido araquidónico no meio de cultura definido de embriões BECM estimula esse desenvolvimento provavelmente pela sua metabolização através da via da ciclo-oxigenase (Lim e Hansel, 1996 e 2000). As PG poderão exercer uma acção embriotrófica, interferindo nos diversos mecanismos fisiológicos necessários ao desenvolvimento embrionário antes da implantação, desde a clivagem, formação do blastocélio pela interferência na dinâmica de fluidos através da membrana até à eclosão da zona pelúcida e alongamento do embrião (Lewis, 1986,1989; Gurevich e Shemesh, 1994; Shemesh *et al.*, 1994; Sayre e Lewis, 1993).

O objectivo deste trabalho foi estudar o efeito da inibição da síntese de PG pela indometacina e, também, o efeito induzido por um desequilíbrio nas PG, a favor da PGE₂, no desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ovários foram recolhidos no matadouro e transportados para o laboratório numa solução de PBS (0,15% albumina sérica bovina e 0,05 mg mL⁻¹ de kanamicina) a 37° C quando destinados à produção de embriões e a 4° C quando destinados à recolha de células da granulosa utilizadas na formação das monocamadas (Marques *et al.*, 1997).

Procedeu-se à aspiração dos folículos com 2 a 6 mm de diâmetro dos ovários transportados a 4° C. As células obtidas, após coloração (azul tripan a 0,4%) e contagem, foram diluídas com meio de cultura (TCM199 + 10% de soro de vaca superovulada em cio (SOCS) + 100 UI de penicilina, 100 µg ml⁻¹ de estreptomicina), suplementado com indometacina (28 µM, Sigma ref. I-7378; Okuda *et al.*, 1995), PGE₂ (1,4 X 10⁻⁷ M, Sigma ref. P-0409; Gurevich *et al.*, 1993) ou sem suplementação (testemunha), de forma a obter uma concentração de 1x10⁶ células mL⁻¹. A cultura da células foi realizada em placa, colocando-se 8 gotas de 100 µL submersas em óleo mineral, durante 2 semanas na estufa incubadora a 39° C, com 5% de CO₂ e saturada de humidade, sendo refrescadas de 48 em 48 horas com meio de cultura suplementado com indometacina (Indo), PGE₂ ou sem suplementação.

Para a produção dos embriões procedeu-se à recolha dos oócitos pela aspiração dos folículos com 2 a 6 mm de diâmetro de ovários transportados do matadouro a 37° C. Os complexos cumulus-oócitos aspirados foram colocados em meio de cultura (TCM199 + 10% SOCS + 100 UI de penicilina e 100 µg ml⁻¹ de estreptomicina) dentro da estufa incubadora durante 22 a 24 horas. Após este período, os oócitos maturados foram inseminados (D0=dia da inseminação) com sémen bovino descongelado e submetido a um processo de *swim-up* em meio Talp. Os oócitos e espermatozóides permaneceram 22 horas no meio de fertilização (gotas de 40 µl com 10 oócitos em cada), após o que foram

divididos em três grupos e transferidos para as monocamadas de células da granulosa (Grupo I - Testemunha, n=461; Grupo II - Indo, n=452; Grupo III - PGE₂, n=465) onde permaneciam 12 dias.

Esta experiência foi realizada em 10 sessões. Procedeu-se à avaliação da clivagem 24 horas após a transferência dos zigotos para as monocamadas e das taxas de embriões (mórulas e blastócitos) em D7 e D8 e de embriões extrusados em D12-13. A qualidade dos embriões em D8 foi avaliada através duma escala de 1 - Muito bom a 4 - Mau. A dinâmica do desenvolvimento embrionário foi estudada entre D7 e D10 e comparados os estádios de desenvolvimento (mórula - M, jovem blastócito - JBL; blastócito - BL; blastócito expandido - BLE, extrusado - EXT) entre grupos. O tratamento estatístico destes dados foi realizado pelo teste do qui-quadrado em tabelas de contingência 2x2, através da comparação dos valores obtidos em cada grupo no somatório de todas as réplicas (StatSoft, Inc., 1995).

RESULTADOS

A suplementação dos meios de cultura de embriões com PGE₂ ou indometacina ao longo de toda a cultura de embriões com células da granulosa influencia significativamente os resultados obtidos nas taxas de clivagem, de embriões em D7 e EXT (quadro 1 e figura 1). A taxa de embriões clivados no grupo PGE₂ é significativamente superior (P=0,04) à da testemunha, não diferindo a taxa do grupo Indo da dos outros grupos. A taxa de embriões em D7 é significativamente superior (P=0,03) no grupo PGE₂ do que no grupo Indo, superioridade que deixa de ser significativa em D8. Neste dia, a taxa de embriões do grupo testemunha passa a ser tendencialmente superior (P=0,07) à do grupo Indo. A taxa de EXT é significativamente inferior no grupo Indo do que nos grupos testemunha e PGE₂ (respectivamente, P=0,001 e P<0,001).

Quadro 1. Efeito da suplementação do meio de cultura de embriões com indometacina (Indo) e PGE₂ sobre a produção de embriões (10 réplicas).

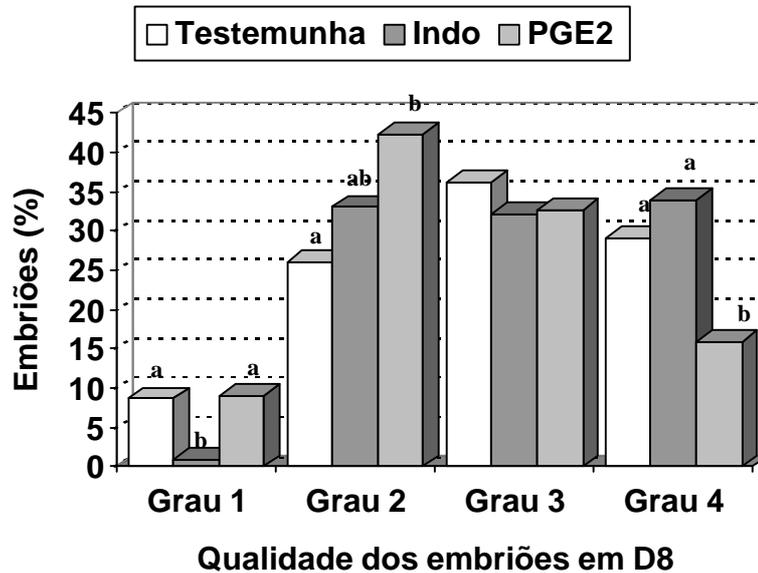
Grupos	Oócitos Insemin.	Embriões Clivados		Embriões em D7		Embriões em D8		Embriões Extrusados	
	n	n	%	n	%	n	%	n	%
I-Testemunha	461	318	68,98a	127	39,94ab	127	39,94	94	74,02a
II - Indo	452	329	72,79ab	112	34,04a	109	33,13	58	53,21b
III - PGE ₂	465	349	75,05b	148	42,41b	132	37,82	103	78,03a
Valor de P (χ ²)		I-III P=0,04		II-III P=0,03		I-II P=0,07		I-II P=0,001 I-III P<0,001	

Quanto à qualidade dos embriões em D8 (quadro 2 e figura 2), a presença da indometacina diminui significativamente a percentagem de embriões de grau 1, quer em relação ao grupo testemunha, quer ao grupo PGE₂ (respectivamente, P=0,007 e P=0,005). Esta diferença desaparece nos embriões de grau 2 e 3. No entanto, no grupo PGE₂, a percentagem de embriões de grau 2 é significativamente superior (P=0,005) à do grupo testemunha e, a de embriões de grau 4, significativamente inferior à de ambos os grupos, testemunha e Indo (respectivamente, P=0,01 e P=0,001).

Quadro 2. Efeito da suplementação do meio de cultura de embriões com Indo ou PGE₂ sobre a qualidade dos embriões D8 (grau 1=muito bom....grau 4=mau; 10 réplicas).

Grupos	Qualidade dos embriões em D8 (%)			
	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
I - Testemunha	8,66a	25,98a	36,22	29,13a
II - Indo	0,92b	33,03ab	32,11	33,95a
III - PGE ₂	9,09a	42,42b	32,58	15,91b
Valor de P (χ ²)	I-II P=0,007 II-III P=0,005	I-III P=0,005	P>0,05	I-III P=0,01 II-III P=0,001

Figura 1. Efeito da indometacina e da PGE₂ incorporadas no meio de cultura de embriões em co-cultura com células da granulosa na qualidade dos embriões em D8.



Quadro 3. Efeito da suplementação do meio de cultura de embriões com indometacina (Indo) ou PGE₂ sobre a dinâmica do desenvolvimento embrionário de D7 a D10 (M=mórula, JBL=jovem blastócito, BL=blastócito, BLE=blastócito expandido, EXT=extrusado; 10 réplicas, excepto D10 com 8 réplicas).

<i>Dia 7</i>	(n)	M (%)	JBL (%)	BL (%)	BLE (%)	
I - Testemunha	127	34,65ab	33,86ab	21,26	10,24	
II - Indo	112	41,96a	26,79a	21,43	9,82	
III - PGE ₂	148	29,05b	39,86b	13,51	17,57	
Valor de P (χ^2)		II-III P=0,03	II-III P=0,03	I-III P=0,09 II-III P=0,09	I-III P=0,08 II-III P=0,08	
<i>Dia 8</i>	(n)	M (%)	JBL (%)	BL (%)	BLE (%)	EXT (%)
I - Testemunha	127	3,15ab	14,96	15,75a	56,69	9,45a
II - Indo	109	6,42a	19,27	20,18a	53,21	0,92b
III - PGE ₂	132	1,52b	21,97	7,58b	62,12	6,82a
Valor de P (χ^2)		II-III P=0,05	P>0,05	I-III P=0,04 II-III P=0,004	P>0,05	I-II P=0,004 II-III P=0,02
<i>Dia 9</i>	(n)	BL (%)	BLE (%)	EXT (%)		
I - Testemunha	127	14,96	41,73ab	43,31ab		
II - Indo	106	17,92	50,94a	31,13a		
III - PGE ₂	128	13,28	33,59b	53,13b		
Valor de P (χ^2)		P>0,05	II-III P=0,007	I-II P=0,06 II-III P=0,001		
<i>Dia 10</i>	(n)	BL (%)	BLE (%)	EXT (%)		
I - Testemunha	107	5,61	25,23a	69,16ab		
II - Indo	83	3,61	38,55b	57,83a		
III - PGE ₂	108	2,78	25,93a	71,3b		
Valor de P (χ^2)		P>0,05	I-II P<0,0001 II-III P<0,0001	II-III P=0,05		

A suplementação dos meios de cultura de embriões com um inibidor da síntese de PG ou com PGE₂ interfere na dinâmica do desenvolvimento embrionário (quadro 3) logo a partir de D7. Neste dia, o grupo Indo está atrasado em relação ao grupo PGE₂, com significativamente mais mórulas e menos JBL (respectivamente, P=0,03 e P=0,03). Ainda em D7, o grupo PGE₂ apresenta tendencialmente menos BL e mais BLE que os grupos testemunha e Indo (respectivamente, BL: P=0,09 e P=0,09; BLE: P=0,08 e P=0,08). Em D8, o grupo Indo apresenta significativamente mais mórulas que o grupo PGE₂ (P=0,05) e menos EXT que os grupos testemunha e PGE₂ (respectivamente, P=0,004 e P=0,02). Em D9, o grupo Indo tem mais BLE que o grupo PGE₂ (50,94 vs. 33,59%, P=0,007) e menos EXT que os grupos testemunha e PGE₂ (respectivamente, 31,13% vs. 43,31 e 53,13% para P=0,06 e P=0,001). O atraso do grupo Indo mantém-se em D10, com significativamente mais BLE que os grupos testemunha e PGE₂ (respectivamente, P<0,001 e P<0,0001) e, menos EXT, que o grupo PGE₂ (P=0,05).

DISCUSSÃO

A suplementação dos meios de cultura de embriões com PGE₂, ao aumentar a taxa de clivagem, está a afectar o desenvolvimento embrionário antes da activação do genoma, que nos bovinos ocorre entre as 8-16 células (King *et al.*, 1988; Barnes e Eyestone, 1990). Por outro lado, esta acção parece prolongar-se e interferir positivamente na activação do genoma e formação de mórulas, evitando o bloqueio ao desenvolvimento embrionário característico deste estadio (Camous *et al.*, 1984; Eyestone e First, 1986).

A acção da PGE₂ confirma a importância da via da ciclo-oxigenase nesta fase do desenvolvimento precoce dos embriões bovinos referida por Gurevich *et al.* (1993), Gurevich e Shemesh, (1994) e Shemesh *et al.* (1994). No entanto, a inibição deste enzima pela indometacina não influencia negativamente a clivagem, provocando mesmo um aumento nesta taxa, o que indica que algum ou alguns metabolitos desta via têm uma acção negativa nesta fase. A PGF2 α já foi identificada como um dos metabolitos exercendo um efeito prejudicial (Pereira, 2001).

A transição do estadio de mórula para BL ocorre 24 horas mais cedo nos embriões produzidos *in vitro* que nos *in vivo*. Esta blastulação precoce, associada a uma menor compactação das mórulas, é apontada como um dos factores responsáveis pela menor viabilidade dos embriões IVP (Greve *et al.*, 1993; Holm e Callesen, 1998). O atraso na formação de BL em D8 devido à acção da PGE₂, que não se verifica na presença da indometacina, aponta para a interferência das PG na blastulação, cujo atraso poderá ser benéfico para o desenvolvimento embrionário *in vitro*, tornando-o mais semelhante ao *in vivo*. Este atraso em D8 aparece associado a uma melhoria significativa da qualidade dos embriões nesse dia.

A suplementação dos embriões com indometacina não afecta significativamente a taxa de embriões em D7, embora em D8 esta taxa tenda (P=0,07) a ser inferior à testemunha. No entanto, esta suplementação diminui significativamente a qualidade dos embriões em D8 e interfere na dinâmica do desenvolvimento embrionário, sobretudo pela sua acção negativa na eclosão dos embriões da zona pelúcida. Esta interferência na eclosão é reforçada pela diminuição significativa da taxa de embriões extrusados.

A diminuição da taxa de embriões extrusados na presença da indometacina está de acordo com os resultados de Biggers *et al.* (1978), Baskar *et al.* (1981) e Sayre e Lewis (1993) que confirmam que os inibidores da síntese de PG reduzem a taxa de embriões que eclodem da zona pelúcida. Esta inibição das PG interfere na dinâmica dos fluidos, prevenindo a expansão do BL necessária à eclosão (Biggers *et al.*, 1978). A indometacina diminui a capacidade das células trofoblásticas de transportarem ²²Na e, como tal, impede a expansão associada ao aumento de fluido no BL (Lewis, 1986).

Os efeitos prejudiciais induzidos pelo bloqueio da síntese de prostaglandinas apontam para a importância destas hormonas nos diferentes estadios do desenvolvimento embrionário precoce. A PGE₂ beneficia a clivagem e o desenvolvimento dos embriões até

D7. Esta prostaglandina parece anular o efeito negativo da blastulação precoce característica dos embriões produzidos *in vitro*, atrasando a transição do estadio de mórula para blastócito em D7 e D8. Este atraso aparece associado a uma melhoria significativa da qualidade dos embriões.

BIBLIOGRAFIA

- Barnes, F.L.; Eyestone, W.H. **1990**. Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. **Theriogenology**, **33**: 141-152.
- Baskar, J.F.; Torchiana, D.F.; Biggers, J.D.; Corey, E.J.; Anderson, N.H.; Subramanian, N. **1981**. Inhibition of hatching of mouse blastocyst *in vitro* by various prostaglandin inhibitors. **J. Reprod. Fert.**, **63**: 359-363.
- Bavister, B.D. **1995**. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Hum. Reprod. update**, **1**: 91-148.
- Biggers, J.D.; Leonov, B.V.; Baskar, J.F.; Fried, J. **1978**. Inhibition of hatching of mouse blastocysts *in vitro* by prostaglandin antagonists. **Biol. Reprod.**, **19**: 519-533.
- Camous, S.; Heyman, Y.; Méziou, W.; Ménéz, Y. **1984**. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. **J. Reprod. Fert.**, **72**: 479-485.
- Eyestone, W.H.; First, N.L. **1986**. A study of the 8-to 16 cell developmental block in bovine embryos cultured *in vitro*. **Theriogenology**, **25**: 152 abst.
- Greve, T.; Avery, B.; Callesen, H. **1993**. Viability of *in-vivo* and *in-vitro* produced embryos. **Reprod. Domest. Anim.**, **28**: 164-169.
- Gurevich, M.; Harel-Markowitz, E.; Marcus, S.; Shore, L.S.; Shemesh, M. **1993**. Prostaglandin production by the oocyte cumulus complex around the time of fertilization and the effect of prostaglandin E on the development of early bovine embryo. **Reprod. Fertili. Dev.**, **5**: 281-283.
- Gurevich, M.; Shemesh, M. **1994**. Induction of cyclooxygenase and prostaglandin E production by the bovine pre-embryo. **Reprod. Fertili. Dev.**, **6**: 687 abst.
- Holm, P.; Callesen, H. **1998**. *In vivo* versus *in vitro* produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. **Reprod. Nutr. Dev.**, **38**: 579-594.
- King, W.A.; Niar, A.; Chartrain, I.; Betteridge, K.J.; Guay, P. **1988**. Nucleolus organizer regions and nucleoli in preattachment bovine embryos. **J. Reprod. Fert.**, **82**: 87-95.
- Kruij, Th.A.M.; Bevers, M.M.; Kemp, B. **2000**. Environment of oocyte and embryo determines health of IVP offspring. **Theriogenology**, **53**: 611-618.
- Lewis, G.S. **1986**. Indomethacin inhibits the uptake of ²²sodium by ovine trophoblastic tissue *in vitro*. **Prostaglandin**, **31**: 111-122.
- Lewis, G.S. **1989**. Prostaglandin secretion by the blastocyst. **J. Reprod. Fert.**, **suppl. 37**: 261-267.
- Lim, J.M.; Hansel, W. **1996**. Roles of growth factors in the development of bovine embryos fertilized *in vitro* and cultured singly in a defined medium. **Reprod. Fertili. Dev.**, **8**: 1199-1205.
- Lim, J.M.; Hansel, W. **2000**. Exogenous substances affecting development of *in vitro*-derived bovine embryos before and after embryonic genome activation. **Theriogenology**, **53**: 1081-1091.
- Marques, C.C.; Pereira, R.M.; Vasques, M.I.; Baptista, M.C.; Horta, A.E.M. **1997**. Influência da refrigeração de ovários dadores na produção de embriões bovinos e cultura de células da granulosa *in vitro*. **1º Congresso Ibérico de Reprodução Animal**, Estoril - 3 a 6 de Julho, vol. II, pp. 136-141.
- Okuda, K.; Uenoyama, Y.; Miyamoto, A.; Okano, A.; Schweigert, F.J.; Schams, D. **1995**. Effects of prostaglandins and oestradiol-17 β on oxytocin binding in cultured bovine luteal cells. **Reprod. Fertili. Dev.**, **7**: 1045-1051.
- Pereira, R.M. **2001**. Efeito de células em co-cultura e alterações induzidas na cascata metabólica do ácido araquidónico sobre o desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos. Dissertação de Doutoramento apresentada à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. pp. 279.
- Sayre, B.L.; Lewis, G.S. **1993**. Arachidonic acid metabolism during early development of ovine embryos: a possible relationship to shedding of the zona pellucida. **Prostaglandins**, **45**: 557-569.
- Shemesh, M.; Gurevich, M.; Harel-Markowitz, E. **1994**. Induction of cyclooxygenase and prostaglandin E2 production by bovine pre-embryos. **J. Reprod. Fert.**, **abst.se. 13**: 42 abst 126.
- StatSoft, Inc. **1995**. STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK.