

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA MATURAÇÃO NUCLEAR  
E DE ANTIOXIDANTES SOBRE A MATURAÇÃO OOCITÁRIA,  
FECUNDAÇÃO E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO BOVINO *IN  
VITRO*.**

**Pós-Graduanda: Letícia Siqueira de Sá Barretto**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gisele Zoccal Mingoti**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

**Jaboticabal - SP**

**Fevereiro - 2007**

B274a Barretto, Leticia Siqueira de Sá  
Avaliação dos efeitos da inibição da maturação nuclear e de antioxidantes sobre a maturação oocitária, fecundação e desenvolvimento embrionário bovino *in vitro* / Leticia Siqueira de Sá Barretto. -- Jaboticabal, 2007  
xxiv, 88 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007  
Orientadora: Gisele Zoccal Mingoti  
Banca examinadora: Joaquim Mansano Garcia, César Roberto Esper, Cláudia Lima Verde Leal, Flávio Vieira Meirelles  
Bibliografia

1. Maturação *in vitro*. 2. Reprodução Animal. 3. Bovinos. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação.

e-mail: [leticiabarretto@ig.com.br](mailto:leticiabarretto@ig.com.br)

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CÂMPUS DE JABOTICABAL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


**TÍTULO:** AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA MATUREÇÃO NUCLEAR E DE ANTIOXIDANTES SOBRE A MATUREÇÃO OOCITÁRIA, FECUNDAÇÃO E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO BOVINO *IN VITRO*

**AUTORA:** LETÍCIA SIQUEIRA DE SÁ BARRETTO

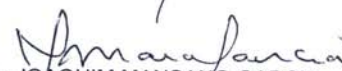
**ORIENTADORA:** Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em MEDICINA VETERINÁRIA área de REPRODUÇÃO ANIMAL pela Comissão Examinadora:

  
Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI


  
Dra. CLAUDIA LIMA VERDE LEAL

  
Dr. FLÁVIO VIEIRA MEIRELLES

  
Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA

  
Dr. CESAR ROBERTO ESPER

Data da realização: 23 de fevereiro de 2007.

  
Presidente da Comissão Examinadora  
Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**LETÍCIA SIQUEIRA DE SÁ BARRETTO** – nascida em São Paulo – SP, aos 18 dias do mês de Setembro de 1975; concluiu o ensino médio na Escola Logos de 1º e 2º Graus, na cidade de São Paulo – SP, em dezembro de 1993. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária no Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC em Lages – SC, em agosto de 1995. Concluiu o curso superior em Medicina Veterinária em julho de 2000. Ingressou no curso de pós-graduação, ao nível de Mestrado, sob orientação da Profª Drª Gisele Zoccal Mingoti, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Câmpus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista – UNESP, em março de 2001, com bolsa de mestrado da FAPESP, e concluiu, em fevereiro de 2003, com a defesa da Dissertação “Avaliação dos efeitos do 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX) e da roscovitina sobre a maturação nuclear, momento de fecundação e competência no desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos”. Ingressou no curso de pós-graduação, ao nível de Doutorado, sob orientação da Profª Drª Gisele Zoccal Mingoti, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Câmpus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista – UNESP, em março de 2003, com bolsa de doutorado da FAPESP.

## EPÍGRAFE

“Dá seu primeiro passo com fé.  
Não é necessário que veja todo o caminho completo.  
Só dê seu primeiro passo...”  
(Martin Luther King Jr.)

## DEDICATÓRIA

Dedico ao meu amor Edson, pela compreensão  
e apoio incondicional.

E aos meus pais, Jorge Antônio Freire de Sá  
Barretto e Elba Siqueira de Sá Barretto, pela  
paciência, apoio e confiança em mim depositados.

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gisele Zocal Mingoti, pela orientação, ensinamentos, disponibilidade, amizade, confiança e dedicação.

Ao Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, pela paciência e disposição em ajudar. Exemplo a ser seguido em busca do conhecimento.

Ao Prof. Dr. César Roberto Esper pelos conhecimentos transmitidos e pelas sugestões na defesa.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cláudia Lima Verde Leal e ao Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles pela disponibilidade em participar da defesa e sugestões.

Ao Prof. Dr. Francisco Guilherme Leite, Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo, Prof. Dr. Paulo Henrique Franceschini pela participação e sugestões na qualificação.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista, e ao departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal – DRA pela oportunidade oferecida.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista, e ao departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal pelas instalações e condições de trabalho.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sílvia Helena Venturoli Perri e ao veterinário e amigo Ricardo Bertolla pelo auxílio na análise estatística.

Aos demais professores do DRA, , Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima e Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente, pela amizade, interesse e conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do DRA, em especial à Roberta Vantini e Isabel Aparecida Penariol Natarelli pela disponibilidade em ajudar. E ao funcionário Adão da UNESP de Araçatuba pela disponibilidade em buscar o material de trabalhado necessário aos experimentos.

Ao meu amor e companheiro Edson, pela paciência, ensinamentos, amizade, apoio e disponibilidade sempre!

À grande amiga Viviane Sgobbi Dias, pelo companheirismo, amizade e cumplicidade durante esses anos.

Aos pós-graduandos Simone Cristina Méo, Alexandre Wolf, Karina Beloti Avelino, Tatiane Drummond Tetzner, Naiara Zoccal Saraiva, Fernanda da Silva Gonçalves, Christina Ramires Ferreira e Felipe Perecin pela amizade e disponibilidade em ajudar.

Aos demais pós-graduandos do DRA, Ana Paula Perini, Andréa Basso, Eric Caiado Castro, Juliana Borges Correa, Lorivaldo Paz Landim Jr, Max Vitória Resende, pelo convívio e amizade.

Às amigas Elaine e Catarina Piffer Gonçalves, Patrícia Helena Miguez e Tatiana Catta Preta, por estar sempre presentes nas dificuldades e conquistas.

À Deus, por me mostrar que caminho seguir...



## **APOIO FINANCEIRO**

Esse projeto foi financiado pela **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, sob processo nº 04/13148-7. Bolsa concedida pela **FAPESP**, sob processo nº 03/06928-5 no período de dezembro de 2003 a novembro de 2006.

## SUMÁRIO

	Página
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>..xiii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>..xvi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>..xviii</b>
<b>AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA MATURAÇÃO NUCLEAR E DE ANTIOXIDANTES SOBRE A MATURAÇÃO OOCITÁRIA, FECUNDAÇÃO E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO BOVINO <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>..xxi</b>
<b>EFFECTS OF NUCLEAR MATURATION INHIBITION AND ANTIOXIDANTS ON OOCYTE MATURATION, FERTILIZATION AND BOVINE EMBRYONIC DEVELOPMENT <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>..xxiii</b>
<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>1</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>3</b>
<b>Revisão da Literatura.....</b>	<b>4</b>
Maturação de oócitos em mamíferos .....	4
Inibidores da maturação <i>in vitro</i> de oócitos .....	6
Antioxidantes.....	8
Apoptose .....	10
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>11</b>
<b>CAPÍTULO 2 – MATURAÇÃO NUCLEAR, DISTRIBUIÇÃO DE GRÂNULOS CORTICAIS E CONCENTRAÇÃO INTRAOOCITÁRIA DE GLUTATIONA EM OÓCITOS TRATADOS COM INIBIDORES DA MATURAÇÃO NUCLEAR E ANTIOXIDANTES .....</b>	<b>19</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>19</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>20</b>
<b>Material e Métodos .....</b>	<b>22</b>

Obtenção dos oócitos.....	22
Seleção dos oócitos .....	22
Maturação dos oócitos .....	22
Métodos de coloração .....	23
Coloração com gel Mowiol-Hoechst.....	23
Coloração de grânulos corticais .....	24
Mensuração da concentração intraocitária de glutathione dos oócitos maturados .....	25
Construção da curva padrão da concentração de GSH .....	26
Delineamento experimental.....	27
Experimento I: Cinética da Maturação Nuclear .....	28
Experimento II: Cinética da Maturação Citoplasmática.....	28
Experimento III: Determinação da Concentração Intraocitária de Glutathione.....	29
Análise Estatística.....	29
<b>Resultados .....</b>	<b>29</b>
Experimento I – Cinética da Maturação Nuclear .....	29
Experimento II – Cinética da Maturação Citoplasmática.....	33
Experimento III – Determinação da Concentração Intraocitária de Glutathione.....	36
<b>Discussão .....</b>	<b>37</b>
Experimento I – Cinética da Maturação Nuclear .....	37
Experimento II – Cinética da Maturação Citoplasmática.....	40
Experimento III – Determinação da Concentração Intraocitária de Glutathione.....	42
<b>Conclusões .....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>45</b>
<b>CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO E DA QUALIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i> APÓS INIBIÇÃO DA MEIOSE COM BUTIROLACTONA I E ROSCOVITINA EM MEIO SUPLEMENTADO COM ANTIOXIDANTES.....</b>	<b>50</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>50</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>51</b>

<b>Material e Métodos</b> .....	<b>52</b>
Obtenção e seleção dos oócitos .....	52
Maturação dos oócitos .....	52
Fecundação <i>in vitro</i> .....	53
Cultivo de desenvolvimento.....	54
Determinação da massa celular interna (MCI) e trofoblasto (TF).....	54
Delineamento experimental.....	55
Experimento I: Momento de fecundação .....	56
Experimento II: Avaliação do desenvolvimento embrionário .....	56
Experimento III: Avaliação da qualidade embrionária .....	57
Análise Estatística .....	57
<b>Resultados</b> .....	<b>57</b>
Experimento I: Momento de fecundação .....	57
Experimento II: Avaliação do desenvolvimento embrionário .....	58
Experimento III: Avaliação da qualidade embrionária .....	60
<b>Discussão</b> .....	<b>62</b>
Experimento I: Momento de fecundação .....	62
Experimento II: Avaliação do desenvolvimento embrionário .....	63
Experimento III: Avaliação da qualidade embrionária .....	66
<b>Conclusões</b> .....	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>67</b>
<b>CAPÍTULO 4 – AVALIAÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO DE DNA EM EMBRIÕES PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i> APÓS FECUNDAÇÃO DE OÓCITOS TRATADOS COM INIBIDORES DA MATURAÇÃO NUCLEAR E ANTIOXIDANTES</b> .....	<b>71</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>71</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>71</b>
<b>Material e Métodos</b> .....	<b>73</b>
Obtenção e seleção dos oócitos .....	73
Maturação dos oócitos .....	73

Fecundação <i>in vitro</i> .....	74
Cultivo de desenvolvimento.....	75
Coloração “Terminal Transferase Assay” – TUNEL .....	75
Ensaio Cometa.....	76
Delineamento experimental.....	77
Experimento I: Avaliação da fragmentação de DNA pela coloração “Terminal Transferase Assay” – TUNEL.....	78
Experimento II: Avaliação da fragmentação de DNA pelo ensaio Cometa.....	79
Análise Estatística .....	79
<b>Resultados .....</b>	<b>79</b>
Experimento I: Avaliação da fragmentação de DNA pela coloração “Terminal Transferase Assay” – TUNEL.....	79
Experimento II: Avaliação da fragmentação de DNA pelo ensaio Cometa.....	81
<b>Discussão .....</b>	<b>83</b>
Experimento I: Avaliação da fragmentação de DNA pela coloração “Terminal Transferase Assay” – TUNEL.....	83
Experimento II: Avaliação da fragmentação de DNA pelo ensaio Cometa.....	84
<b>Conclusões .....</b>	<b>86</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>86</b>

## LISTA DE TABELAS

**Página**

<b>CAPÍTULO 2 – MATURAÇÃO NUCLEAR, DISTRIBUIÇÃO DE GRÂNULOS CORTICAIS E CONCENTRAÇÃO INTRAOOCITÁRIA DE GLUTATIONA EM OÓCITOS TRATADOS COM INIBIDORES DA MATURAÇÃO NUCLEAR E ANTIOXIDANTES .....</b>	<b>19</b>
<b>Tabela 1</b> – Estádio nuclear de oócitos pré-maturados durante 8 horas com inibidores da maturação nuclear (butirolactona I ou roscovitina) e antioxidantes (cisteamina ou $\beta$ -mercaptoetanol) .....	30
<b>Tabela 2</b> – Estádio nuclear de oócitos pré-maturados durante 16 horas com inibidores da maturação nuclear (butirolactona I ou roscovitina) e antioxidantes (cisteamina ou $\beta$ -mercaptoetanol) .....	30
<b>Tabela 3</b> – Estádio nuclear de oócitos pré-maturados durante 24 horas com inibidores da maturação nuclear (butirolactona I ou roscovitina) e antioxidantes (cisteamina ou $\beta$ -mercaptoetanol) .....	31
<b>Tabela 4</b> – Estádio nuclear de oócitos pré-maturados durante 24 horas com inibidores da maturação nuclear (butirolactona I ou roscovitina) e antioxidantes (cisteamina ou $\beta$ -mercaptoetanol) seguidos do cultivo de maturação por 8 horas .....	32
<b>Tabela 5</b> – Estádio nuclear de oócitos pré-maturados durante 24 horas com inibidores da maturação nuclear (butirolactona I ou roscovitina) e antioxidantes (cisteamina ou $\beta$ -mercaptoetanol) seguidos do cultivo de maturação por 16 horas .....	32
<b>Tabela 6</b> – Estádio nuclear de oócitos pré-maturados durante 24 horas com inibidores da maturação nuclear (butirolactona I ou roscovitina) e antioxidantes (cisteamina ou $\beta$ -mercaptoetanol) seguidos do cultivo de maturação por 24 horas .....	33
<b>Tabela 7</b> – Avaliação da maturação citoplasmática pela distribuição de grânulos corticais em oócitos pré-maturados durante 24 horas com inibidores da maturação nuclear (butirolactona I ou roscovitina) e antioxidantes (cisteamina ou $\beta$ -mercaptoetanol) .....	34

<b>Tabela 8</b> – Avaliação da maturação citoplasmática pela distribuição de grânulos corticais em oócitos pré-maturados durante 24 horas com inibidores da maturação nuclear (butirolactona I ou roscovitina) e antioxidantes (cisteamina ou $\beta$ -mercaptoetanol) seguidos do cultivo de maturação por 16 horas .....	35
<b>Tabela 9</b> – Avaliação da maturação citoplasmática pela distribuição de grânulos corticais em oócitos pré-maturados durante 24 horas com inibidores da maturação nuclear (butirolactona I ou roscovitina) e antioxidantes (cisteamina ou $\beta$ -mercaptoetanol) seguidos do cultivo de maturação por 24 horas .....	35
<b>Tabela 10</b> - Concentração de glutatona intracelular por oócito submetidos a diferentes condições de maturação por 24 horas.....	36

**CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO E DA QUALIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* APÓS INIBIÇÃO DA MEIOSE COM BUTIROLACTONA I E ROSCOVITINA EM MEIO SUPLEMENTADO COM ANTIOXIDANTES .....**

<b>Tabela 1</b> - Desenvolvimento embrionário de oócitos pré-maturados durante 24 horas com inibidores da maturação nuclear (butirolactona I ou roscovitina) seguidos do cultivo de maturação por 16, 20 ou 24 horas .....	58
<b>Tabela 2</b> – Desenvolvimento embrionário de oócitos pré-maturados durante 24 horas com inibidores da maturação nuclear (butirolactona I ou roscovitina) e antioxidantes (cisteamina ou $\beta$ -mercaptoetanol) seguidos do cultivo de maturação por 20 horas. ....	59
<b>Tabela 3</b> – Porcentagem média de células da MCI e TF, em relação ao número total de células dos blastocistos corados por meio de coloração diferencial por fluorocromo após 168 horas de fecundação dos oócitos maturados em diferentes meios.....	61

**CAPÍTULO 4 – AVALIAÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO DE DNA EM EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO* APÓS FECUNDAÇÃO DE OÓCITOS TRATADOS COM INIBIDORES DA MATURAÇÃO NUCLEAR E ANTIOXIDANTES .....**

<b>Tabela 1</b> – Porcentagem de células em apoptose verificadas pela técnica do TUNEL e tamanho (número médio de células/blastocisto) de embriões produzidos de oócitos maturados em diferentes meios.....	80
<b>Tabela 2</b> – Porcentagem de fragmentação de DNA total de embriões submetidos à técnica do Cometa provenientes de oócitos maturados em diferentes meios.....	82



## LISTA DE FIGURAS

**Página**

<b>CAPÍTULO 2 – MATURAÇÃO NUCLEAR, DISTRIBUIÇÃO DE GRÂNULOS CORTICAIS E CONCENTRAÇÃO INTRAOOCITÁRIA DE GLUTATIONA EM OÓCITOS TRATADOS COM INIBIDORES DA MATURAÇÃO NUCLEAR E ANTIOXIDANTES .....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 1</b> - Fotomicrografia das diversas fases da maturação nuclear de oócitos bovinos observados sob microscópio de epifluorescência A) Oócitos em VG: cromossomos descondensados; B) Oócitos em M I: cromossomos condensados; C) Oócitos em M II: cromossomos condensados na placa metafásica e no primeiro corpúsculo polar (1° CP) .....	24
<b>Figura 2</b> - Fotomicrografia das diversas fases da maturação citoplasmática de oócitos bovinos observados sob microscópio de epifluorescência A) GC dispostos em “clusters” no interior do oócito (oócito imaturo); B) GC dispostos tanto no centro como na periferia do oócito (oócito parcialmente maturo); C) GC dispostos na periferia do oócito (oócito maturo) .....	25
<b>Figura 3</b> - Curva padrão de glutathiona .....	27
<b>Figura 4</b> – Concentração de GSH intracelular em oócitos maturados em diferentes meios de cultura por 24 horas .....	37
<b>CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO E DA QUALIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i> APÓS INIBIÇÃO DA MEIOSE COM BUTIROLACTONA I E ROSCOVITINA EM MEIO SUPLEMENTADO COM ANTIOXIDANTES .....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 1</b> – Desenvolvimento embrionário de oócitos pré-maturados durante 24 horas com inibidores da maturação nuclear (butirolactona I ou roscovitina) e antioxidantes (cisteamina ou $\beta$ -mercaptoetanol) seguidos do cultivo de maturação por 20 horas. ....	60

**Figura 2** – Blastocisto corado pela técnica de coloração diferencial, 168 horas após FIV, observado em microscópio de epifluorescência.

Azul: núcleo de células da massa celular interna (MCI), Hoechst 33342; Rosa: núcleo de células do trofoblasto (TF), iodeto de propídeo. ....61

**Figura 3** – Percentagem de células da MCI e TF dos blastocistos desenvolvidos por 168 horas provenientes de oócitos maturados *in vitro* em diferentes meios de cultura. ....62

#### **CAPÍTULO 4 – AVALIAÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO DE DNA EM EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO* APÓS FECUNDAÇÃO DE OÓCITOS TRATADOS COM INIBIDORES DA MATURAÇÃO NUCLEAR E ANTIOXIDANTES.....71**

**Figura 1** - Classificação da integridade de DNA total (Modificado de ANDERSON et al., 1994 e VISVARDS et al., 1997). (0) célula onde ocorreu pouca quebra de DNA e apenas difusão do DNA no gel, (1) pequena quebra e pouca migração de DNA, (2) quebra e migração parcial de DNA, (3) quebra e migração de DNA acetuada e (4) grande quebra e alta migração de DNA. ....77

**Figura 2** – Blastocistos corados pela técnica de coloração TUNEL, 168 horas após FIV, observados em microscópio de epifluorescência. A) Controle Positivo TUNEL – tratados com DNase I; B) Controle Negativo TUNEL – tratados sem TdT; C) Blastocisto que apresentou fragmentação do DNA. As setas demonstram locais da quebra do DNA dentro do núcleo. (TdT – enzima “terminal deoxinucleotidyl transferase”). ....80

**Figura 3** – Percentual de fragmentação do DNA encontradas em blastocistos corados por TUNEL após 168 horas de fecundação dos oócitos maturados em diferentes meios. ....81

**Figura 4** – Classes de fragmentação de DNA em blastômeros de blastocistos produzidos 168 horas após FIV.....82

## LISTA DE ABREVIATURAS

A I.....	Anáfase I
ANOVA.....	Análise de variância
ATP.....	Trifosfato de adenosina
$\beta$ ME.....	$\beta$ -Mercaptoetanol
B.....	Butirolactona I
Bl.....	Blastocisto
BSA.....	Albumina sérica bovina
°C.....	Graus Celsius
cdc.....	Ciclo de divisão celular
CDKs.....	Cinases dependente de cíclicas
CIS.....	Cisteamina
CIV.....	Cultivo <i>in vitro</i>
CO <sub>2</sub> .....	Dióxido de carbono
COC.....	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
CP.....	Corpúsculo polar
DNA.....	Ácido desoxirribonucléico
EPM.....	Erro padrão da média
FITC-LCA.....	<i>Lens culinaris</i> aglutinina conjugado à isotiocianato de fluoresceína
FIV.....	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH.....	Hormônio folículo estimulante
GC.....	Grânulos corticais
GVBD.....	Quebra da vesícula germinativa
GSH.....	Glutathiona
[GSHi].....	Concentração intracelular de glutathiona
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	Peróxido de hidrogênio
hCG.....	Gonadotrofina coriônica humana
hpi.....	Horas pós-inseminação

LH.....	Hormônio luteinizante
LMP.....	“Low melting point”
mA.....	Mili ampere
M I.....	Metáfase I
MII.....	Metáfase II
MAP.....	Proteína ativada por mitógeno
MAPK.....	Proteína ativada por mitógeno cinase
MCI.....	Massa celular interna
MIV.....	Maturação <i>in vitro</i>
mL.....	Mililitro
mm.....	Milímetro
mM.....	Milimol
MPF.....	Fator promotor de maturação
n.....	Número
nm.....	Nanômetro
O <sub>2</sub> .....	Oxigênio
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	Ânion superóxido
OH <sup>-</sup> .....	Radical hidroxila
OMI.....	Inibidor de maturação oocitária
OPT.....	“O-phthaldialdehyde”
PBS.....	Solução salina em tampão fosfato
PHE.....	Penicilamina, hipotaurina e epinefrina
PIV.....	Produção <i>in vitro</i> de embriões
pMol.....	Picomol
PVP.....	Polivinil pirrolidona
R.....	Roscovitina
RNA.....	Ácido ribonucléico
ROS.....	Espécies reativas ao oxigênio
SAS.....	“Statistical analysis system”
SB.....	Solução de bloqueio

SEAM.....	Solução de extração de ácido meta-fosfórico
SFB.....	Soro fetal bovino
SOF.....	Fluido sintético do oviduto
T I.....	Telófase I
TALP.....	“Tyrode’s Albumin Lactate and Pyruvate”
TCM 199.....	“Tissue culture medium 199”
TdT.....	Enzima terminal deoxinucleotidil transferase
TF.....	Trofoblasto
TG.....	Tampão de glutathiona
TUNEL.....	“ <i>In situ</i> terminal deoxinucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay”
UI.....	Unidade Internacional
VG.....	Vesícula germinativa
µL.....	Microlitro
µM.....	Micromol
%.....	Porcentagem

**AValiação DOS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA MATURAÇÃO NUCLEAR E DE  
ANTIOXIDANTES SOBRE A MATURAÇÃO OOCITÁRIA, FECUNDAÇÃO E  
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO BOVINO *IN VITRO*.**

**RESUMO** – O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação do meio de maturação com roscovitina, butirolactona I, cisteamina e  $\beta$ -mercaptoetanol na maturação oocitária e suas conseqüências na fecundação e desenvolvimento embrionário bovino *in vitro*, além da variabilidade da freqüência de danos ao DNA embrionário. Oócitos foram maturados a 38,8°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> em ar em meio TCM-199 suplementado com 0,6% BSA, 0,5  $\mu$ g FSH, 100 UI hCG e 1  $\mu$ g estradiol/mL (controle - C), adicionado de 50  $\mu$ M de cisteamina (CC) ou 50  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol (CM). O grupo padrão do laboratório (S) foi suplementado com 10% de SFB como fonte protéica. Os oócitos em meio suplementado com butirolactona I ou roscovitina foram pré-maturados por 24 horas em meio TCM-199 suplementado com 0,3% BSA, antibiótico e piruvato, de acordo com os grupos: 100  $\mu$ M de butirolactona I (CB), 100  $\mu$ M de butirolactona I + 50  $\mu$ M de cisteamina (CBC), 100  $\mu$ M de butirolactona I + 50  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol (CBM), 25  $\mu$ M de roscovitina (CR), 25  $\mu$ M de roscovitina + 50  $\mu$ M de cisteamina (CRC) e 25  $\mu$ M de roscovitina + 50  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol (CRM). Após o cultivo de pré-maturação, foram transferidos para gotas com meio controle para maturação por 8, 16 e 24 horas, para avaliação da maturação nuclear e citoplasmática, e dosagem da [GSHi]. A fecundação foi realizada após 24 horas do início do cultivo de maturação (grupos sem inibidores), e 20 horas (grupos com inibidores). O cultivo de desenvolvimento foi realizado em meio SOF-Modificado suplementado com 0,5% de BSA e 2,5% de SFB à temperatura de 38,8°C por 192 horas. Observou-se que a butirolactona I é capaz de bloquear a maturação meiótica de maneira reversível e mais eficiente que a roscovitina, e que os antioxidantes não interferiram na retomada da maturação nuclear. A butirolactona I, ao contrário da roscovitina, interferiu no reposicionamento dos GC atrasando a maturação citoplasmática. A adição de antioxidantes cisteamina e  $\beta$ -mercaptoetanol no cultivo de

maturação não proporcionou aumento da [GSHi] nos oócitos. Os resultados mostraram que o bloqueio da meiose de oócitos com butirolactona I não prejudicou a subsequente fecundação e nem o desenvolvimento embrionário, ao contrário do bloqueio com roscovitina que influenciou negativamente estes parâmetros. A adição dos antioxidantes ao meio de maturação não influenciou na produção e na qualidade dos blastocistos. A taxa de apoptose celular e fragmentação de DNA nos embriões produzidos *in vitro* são maiores naqueles maturados com SFB que com butirolactona I e  $\beta$ -mercaptoetanol.

**Palavras-Chave:** Maturação *in vitro*, fecundação *in vitro*, oócito, bovino, grânulos corticais, glutathiona, embrião, antioxidantes, butirolactona I, roscovitina.

**EFFECTS OF NUCLEAR MATURATION INHIBITION AND ANTIOXIDANTS ON  
OOCYTE MATURATION, FERTILIZATION AND BOVINE EMBRYONIC  
DEVELOPMENT *IN VITRO***

**ABSTRACT** - The aim of this work was to evaluate the effects of maturation media supplementation with roscovitine, butyrolactone I, cysteamine and  $\beta$ -mercaptoethanol on oocyte maturation and the consequences on fertilization and bovine embryo development *in vitro*, and also DNA damage frequency in embryos. Oocytes were matured at 38.8°C under a 5% CO<sub>2</sub> in air environment, in TCM-199 medium supplemented with 0.6% BSA, 0.5  $\mu$ g FSH, 100 IU hCG and 1  $\mu$ g estradiol/mL (control group - C) and with either 50  $\mu$ M cysteamine (CC group) or 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol (CM group). The standard group of the laboratory (S group) was supplemented with 10% FCS as protein source. The oocytes in which groups were pre-incubated for 24 hours with butyrolactone I and roscovitine in TCM-199 medium supplemented with 0.3% BSA, antibiotic and pyruvate were cultured according to the groups: 100  $\mu$ M butyrolactone I (CB), 100  $\mu$ M butyrolactone I + 50  $\mu$ M cysteamine (CBC), 100  $\mu$ M butyrolactone I + 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol (CBM), 25  $\mu$ M roscovitine (CR), 25  $\mu$ M roscovitine + 50  $\mu$ M cysteamine (CRC) and 25  $\mu$ M roscovitine + 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol (CRM). After the pre-incubation, the oocytes were transferred to the control maturation medium for 8, 16 and 24 hours for evaluation of nuclear and cytoplasmic maturation and [GSHi] dosage. For IVF, the oocytes were fertilized at 24 hours after the beginning of maturation (groups without inhibition), or 20 hours (groups with inhibition). Embryo culture was in SOF-Modified medium supplemented with 0.5% BSA and 2.5% FCS at 38.8°C for 192 hours. We observed that butyrolactone I is capable of reversibly blocking meiotic maturation more effectively than roscovitine, and that addition of antioxidants did not interfere with resumption of nuclear maturation. Unlike roscovitine, butyrolactone I interfered with repositioning of the cortical granules, thus delaying cytoplasmic maturation. Addition of cysteamine and  $\beta$ -mercaptoethanol to the maturation media did not increase [GSHi] in the oocytes. Results show that blocking maturation with butyrolactone I was not prejudicial to fertilization and to subsequent



embryo development, while roscovitine decrease both fertilization and embryo development rates. Addition of antioxidants to the maturation media did not alter blastocyst production or quality. Both apoptotic and DNA fragmentation rates in *in vitro* produced embryos are higher when maturation media contains FCS than when it contains butyrolactone I and  $\beta$ -mercaptoethanol.

**Key words:** *In vitro* maturation, *in vitro* fertilization, oocyte, bovine, cortical granules, glutathione, embryo, antioxidants, butyrolactone I, roscovitine.

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### Introdução

O oócito adquire progressivamente a habilidade de retomar e concluir a meiose durante a foliculogênese (LONERGAN et al., 1994), e adquire plena capacidade de desenvolvimento somente ao final da foliculogênese. Oócitos removidos de folículos menores que 1 mm de diâmetro podem reiniciar a meiose quando cultivados *in vitro*, porém somente oócitos obtidos de folículos maiores que 2 mm são capazes de atingir o estágio de metáfase II. Ainda, estudos têm demonstrado que a capacidade de desenvolvimento do oócito bovino maturado *in vivo* é superior à do maturado *in vitro*. Esta diferença é possivelmente atribuída às ações capacitantes que o folículo dominante exerce sobre o oócito, ações estas que são abolidas durante o processo de maturação *in vitro*. Trabalhos demonstraram que o oócito sofre significantes modulações quando está incluso no folículo dominante, especialmente em relação à sua ultraestrutura e atividades funcionais (HYTTEL et al., 1997). Devido a isto, tem-se atribuído ao folículo um papel fundamental na aquisição da plena competência de desenvolvimento do oócito. É durante esta fase de desenvolvimento que o oócito atinge sua capacidade plena e, devido a este fato, o termo “capacitação oocitária” foi sugerido (HYTTEL et al., 1997).

*In vivo*, oócitos meioticamente competentes são mantidos no estágio de vesícula germinativa (VG) no ambiente folicular até que ocorra o pico pré-ovulatório de gonadotrofinas, o que estimula a maturação do oócito. Baseado nos estudos de HYTTEL et al. (1997), fica claro que a maturação não se trata apenas da ativação de um gameta quiescente, sendo o apogeu de uma série de longos processos preparatórios. Após a conclusão da maturação, o oócito secundário haplóide torna-se equipado com toda a maquinaria celular necessária para permitir o sucesso da fertilização e do desenvolvimento embrionário inicial.

Oócitos utilizados para fins de biotecnologia *in vitro* são geralmente obtidos de folículos de 2-8 mm de diâmetro. Assim que são removidos do ambiente inibitório do

folículo, os oócitos meioticamente competentes retomam espontaneamente o processo de meiose. Porém, uma fração destes oócitos não adquire plena competência citoplasmática. Desta forma, a inibição reversível da meiose pela butirolactona I e pela roscovitina pode ser explorada usando-se um duplo sistema de cultura com pré-maturação com inibidores seguida de maturação, com o objetivo de aumentar a competência de desenvolvimento dos oócitos (PONDERATO et al., 2001). Estudos de cocristalização indicaram que a butirolactona I e a roscovitina seguem o mesmo caminho inibitório: essas duas moléculas competem com o ATP versus o sítio de ligação do ATP da cdc2 cinase, bloqueando a atividade de fosforilação (PONDERATO et al., 2001).

Na maioria das espécies, o início do desenvolvimento de embriões fertilizados *in vivo* ocorre no lúmen do oviduto (BATTERIDGE, 1995), o qual mantém uma pressão de O<sub>2</sub> mais baixa que a da atmosfera (BISHOP, 1956; MAAS et al., 1976), protegendo assim os embriões de mamíferos do estresse oxidativo (MASTROIANNI e JONES, 1965; LI e FOOTE., 1993; NODA et al., 1994; WATSON et al., 1994). Em sistemas de cultivo *in vitro*, o estresse oxidativo ocorre quando o acúmulo de espécies reativas ao oxigênio (ROS) ultrapassa a capacidade antioxidante do sistema. A alta concentração de O<sub>2</sub> atmosférico induz a geração de radicais livres que são produzidos por várias vias metabólicas e enzimas do oócito, embrião ou das células foliculares (células do *cumulus*) co-cultivadas com estes. O estresse oxidativo danifica os embriões ao causar peroxidação de fosfolipídeos de membrana e alterar muitos tipos de moléculas celulares, tais como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (NASR-ESFAHANI et al., 1990). As conseqüências incluem alterações mitocondriais, bloqueio de desenvolvimento, depleção do ATP e apoptose (KOWALTOWSKI e VERCESI, 1999; HYSLOP et al., 1988; YANG et al., 1998). Assim, a adição de antioxidantes ao meio de cultura tem se demonstrado efetiva na manutenção e desenvolvimento embrionário *in vitro* (TAKAHASHI et al., 1993; LIM et al., 1996; CAAMAÑO et al., 1996; LIM et al., 1999).

Indubitavelmente, muitos fatores biológicos agem de forma conjunta para preparar o oócito imaturo para um desenvolvimento bem sucedido e um embrião

competente depois da fecundação. Defeitos na maturação oocitária podem possivelmente ser causados por uma inadequada maturação nuclear ou citoplasmática, ou mesmo por uma falha em ambas (YANG et al., 1998). A compreensão exata das necessidades metabólicas do oócito em sistemas de cultivo de maturação *in vitro* pressupõe a necessidade de novas pesquisas até que seja estabelecida a condição ideal para que o maior número possível de oócitos maturados *in vitro* adquira a competência de desenvolvimento e torne-se hábil para sustentar o desenvolvimento inicial do embrião.

Com este intuito, este trabalho busca acrescentar informações referentes às necessidades metabólicas/fisiológicas para a adequada capacitação/maturação do oócito e, baseado nestas necessidades, definir um sistema de cultivo que aumente a produção e a qualidade dos embriões bovinos produzidos *in vitro*. Para isso, este trabalho tem por objetivo principal avaliar os efeitos da suplementação do meio de pré-maturação com Butirolactona I ou Roscovitina por 8, 16 ou 24 horas seguido do cultivo de maturação *in vitro*, além da suplementação com os antioxidantes  $\beta$ -mercaptoetanol ou cisteamina, sobre o retardo na maturação nuclear de oócitos, maturação citoplasmática, momento da fecundação e competência no desenvolvimento de embriões bovinos.

### **Objetivos**

1. Avaliar a eficácia da roscovitina e da butirolactona I como inibidores da maturação nuclear no meio de pré-maturação por 8, 16 ou 24 horas e relacionar a competência oocitária e a fase da meiose nos tempos de 8, 16 e 24 horas do início do cultivo de maturação do oócito bovino.

2. Avaliar o efeito da suplementação do meio de pré-maturação e maturação com antioxidantes ( $\beta$ -mercaptoetanol ou cisteamina) sobre a competência oocitária, cinética da maturação nuclear, fecundação e competência do desenvolvimento embrionário *in vitro*.

3. Definir qual o melhor momento para realizar a fecundação de oócitos maturados *in vitro*, em meio suplementado com roscovitina, butirolactona I,  $\beta$ -mercaptoetanol e cisteamina por 16, 20 ou 24 horas.

4. Verificar a competência no desenvolvimento embrionário *in vitro* após a fecundação de oócitos previamente submetidos ao retardo da maturação nuclear com suplementação de roscovitina e butirolactona I no meio pré-maturação por 8, 16 ou 24 horas.

5. Avaliar o efeito da suplementação do meio de maturação com antioxidantes e inibidores da maturação sobre a variabilidade da frequência de danos no DNA.

6. Estabelecer correlações entre danos no DNA e taxa de maturação, fecundação e de desenvolvimento de embriões até o estágio de blastocisto.

## Revisão da Literatura

### Maturação de oócitos em mamíferos

Denomina-se maturação meiótica a conversão de oócitos imaturos plenamente crescidos, inclusos no folículo antral, em oócitos maduros não fecundados, anteriormente à ovulação. A maturação meiótica refere-se à progressão nuclear do estágio dictióteno até a M II (primeira redução meiótica), assim como às alterações metabólicas necessárias para a ativação do oócito após a fecundação (MINGOTI, 1995).

A maturação compreende todos os eventos que permitem ao oócito expressar seu potencial máximo de desenvolvimento após a fecundação. Durante a maturação, os oócitos sofrem várias alterações nucleares e citoplasmáticas. Os eventos nucleares incluem: quebra da vesícula germinativa (GVBD), desaparecimento do nucléolo, condensação da cromatina, extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico, enquanto os eventos citoplasmáticos incluem: redistribuição das organelas intracelulares (mitocôndrias migram para posição perinuclear e grânulos corticais depositam-se abaixo da membrana vitelina) e maturação dos mecanismos de liberação do  $\text{Ca}^{2+}$ . A retomada da meiose coincide com a expansão das células do

*cumulus* na superfície do oócito (revisado por HE et al., 1997). Sabe-se que grânulos corticais (GC) são grânulos secretores, cujo exsudato é capaz de alterar a função e promover o endurecimento da zona pelúcida (CHERR et al., 1988). Baseado nestas modificações morfológicas, o processo de maturação nuclear é dividido nos estádios da meiose: vesícula germinativa (VG), caracterizada por um núcleo visível e proeminente, diacinese (D), metáfase I (M I), anáfase I (A I), telófase I (T I) e metáfase II (M II) (DONAHUE, 1968; MOTLIK e FULKA, 1976; MOTLIK et al., 1978). Ainda podemos citar a fase de metáfase III (M III) descrita por KUBIAK (1989) e ARAKI et al. (1996) que observaram a emissão do segundo corpúsculo polar em oócitos de camundongo.

Quando incluso no folículo ovulatório de *Graaf in vivo*, o oócito retoma a maturação meiótica após o pico pré-ovulatório de gonadotrofinas (hormônio folículo estimulante - FSH e hormônio luteinizante - LH), as quais induzem alterações fisiológicas na atividade das células do *cumulus* (MASUI e CLARKE, 1979). As funções principais do LH são a estimulação da maturação folicular final, a ativação do oócito para que reinicie a meiose (encontra-se em prófase I), a ovulação e a luteinização das células da granulosa e da teca que formarão o corpo lúteo (BÓ et al., 2000).

Em cultivo *in vitro*, os complexos-*cumulus*-oócito (COCs) isolados em meio simples de cultivo retomam a meiose espontaneamente, mesmo na completa ausência de hormônios (PINCUS e ENZMANN, 1935), provavelmente pela simples remoção de algum fator inibitório presente no folículo íntegro. Tem sido sugerido que o inibidor da maturação oocitária (OMI), produto das células da granulosa, mantém o oócito em estágio dictióteno da primeira prófase meiótica (TSAFRIRI, 1985). O OMI é um polipeptídeo que é encontrado no fluido folicular de ovários de uma variedade de mamíferos e que impede o oócito de sofrer maturação meiótica espontânea quando cultivado *in vitro* (WASSARMAN e ALBERTINI, 1994).

A segunda divisão meiótica começa em M II, mas não é completa até que ocorra a penetração do espermatozóide. O término da segunda divisão meiótica é acompanhado da extrusão do segundo corpúsculo polar para o espaço perivitelino (GORDON, 1994). A retomada da meiose (M II) em oócitos mamíferos é acompanhada de um substancial aumento na atividade de muitas cinases (CROSBY et al., 1984;

BORNSLAEGER et al., 1986; KASTROP et al., 1990). O componente central desta atividade é o fator promotor de maturação (MPF). O MPF é uma serina/treonina proteína cinase composta por uma subunidade regulatória, a ciclina B, e uma subunidade catalítica, p34<sup>cdc2</sup> (LOHKA et al., 1988; LABBÉ et al., 1989). Um possível papel da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) durante o início e progressão da meiose foi reportado por FISSORE et al. (1996).

### **Inibidores da maturação *in vitro* de oócitos**

Muitos inibidores químicos potentes da retomada da meiose podem ser usados *in vitro*. Em bovinos e em outros animais de grande porte, a síntese protéica é requerida para completar a maturação nuclear (SIRARD et al., 1989; MOTLIK et al., 1990; KASTROP et al., 1991). O uso de inibidores da síntese protéica permite o cultivo de oócitos bovinos de maneira reversível na retomada da meiose (LONERGAN et al., 1998).

*In vivo*, os oócitos alcançam a aquisição da maturação do citoplasma (capacitação) e a competência para retomar a meiose (maturação) depois de uma série longa de processos preparatórios envolvendo transcrição e conseqüente tradução de transcritos durante a prófase meiótica (GOSDEN et al., 1997; HYTTEL et al., 1997). A retomada da meiose envolve a condensação dos cromossomos, que resulta em um súbito bloqueio da transcrição e é acompanhada de profundas modificações no padrão de neossíntese protéica (WU et al., 1996; LONERGAN et al., 1997). Os eventos moleculares relacionados a esta diferenciação tardia do oócito não são conhecidos, mas suspeita-se que transcritos e proteínas são estocados em uma forma estável durante este período e têm uma importante função durante o desenvolvimento embrionário precoce, quando o genoma embrionário permanece quiescente (MERMILLOD et al., 2000).

Durante a maturação citoplasmática, o aumento pronunciado na atividade das cinases inicia uma complexa cascata de fosforilação de proteína específica e desfosforilação, envolvendo um número de cinases, como o MPF e a família da MAPK (MOTLIK et al., 1998).

No caminho da tradução, o MPF é uma cinase envolvida na divisão celular e na regulação do ciclo de transição da célula G2/M de todas as células eucarióticas. A ativação do MPF é também um ponto chave da retomada da meiose em oócitos que correspondem à transição da G2/M (revisto por EPPIG et al., 1996). A ativação do MPF é um processo “two-steps” envolvendo a formação de um complexo entre a subunidade da cinase (p34<sup>cdc2</sup>, homóloga ao produto do gene *cdc2* da levedura) e uma subunidade regulatória (ciclina B). Uma vez formado esse complexo pode ser ativado pela desfosforilação da treonina 14 e resíduos da tirosina 15 da subunidade p34. Assim, em bovinos, a atividade do MPF requer tanto a neossíntese protéica como as cascatas de fosforilação/desfosforilação. A estabilidade da atividade do MPF pode ser prevenida por drogas que agem nesses dois níveis (MERMILLOD et al., 2000).

A maturação nuclear do oócito não é suficiente para resultar no subsequente desenvolvimento embrionário. Pode-se hipotetizar que se oócitos são cultivados *in vitro* antes da maturação sob condições que mantém estacionado o estágio de vesícula germinativa (VG), estes podem ter a oportunidade de adquirir uma grande competência no desenvolvimento. Tentativas têm sido feitas com o intuito de manter a meiose estacionada com estabilização farmacológica (realizada pelo cicloheximide, 6-dimetilaminopurina, butirolactona I, roscovitina) ou com inibidores fisiológicos (células da teca) (RICHARD et al., 1997; SAEKI et al., 1997; AVERY et al., 1998; KUBELKA et al., 2000; MERMILLOD et al., 2000).

Roscovitina, uma purina conhecida especificamente por inibir a atividade da MPF cinase em numerosos sistemas celulares, mantém oócitos bovinos no estágio de vesícula germinativa (MERMILLOD et al., 2000). A roscovitina é um inibidor seletivo das cinases dependentes de ciclinas cdk 1, 2 e 5 (KNOCKAERT et al., 2002). MERMILLOD et al. (2000) investigaram o uso de 25 µM de roscovitina por 24 horas para demonstrar que é possível o cultivo de oócitos bovinos com inibidor de meiose sem diminuir seus resultados no potencial de desenvolvimento.

Butirolactona I é um dos compostos que funcionam como um potente, específico e reversível inibidor da quebra da vesícula germinativa (GVBD). Esta molécula age como um inibidor competitivo do ATP, é um inibidor potente e específico de cinases



dependente de ciclinas (cdks), e tem algum efeito inibitório em outras proteínas cinases como a MAPK (KITAGAWA et al., 1993, 1994; MOTLIK et al., 1998). Recentemente, KUBELKA et al. (2000), demonstraram que a butirolactona I na concentração de 100  $\mu\text{M}$  pode manter a meiose estacionada em bovinos por 24 a 28 horas.

Estudos de cocristalização indicaram que a butirolactona I e a roscovitina seguem o mesmo caminho inibitório: essas duas moléculas competem com o ATP versus o sítio de ligação do ATP da cdc2 cinase, bloqueando a atividade de fosforilação. Esta inibição é reversível e pode ser explorada usando-se um duplo sistema de cultura com pré-maturação com inibidores seguida de maturação, com o objetivo de aumentar a competência de desenvolvimento dos oócitos (PONDERATO et al., 2001). Derivados de purinas mais específicos, direcionados para a inibição do MPF, têm sido recentemente designados e usados com sucesso para prevenir a divisão celular e retomada da meiose em organismos menores (revisado por MEIJER, 1996; MEIJER e KIM, 1997).

### **Antioxidantes**

No metabolismo celular, durante o desenvolvimento embrionário, as espécies reativas de oxigênio (ROS), que incluem ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e radical hidroxila ( $\text{OH}^-$ ), são constantemente liberadas do processo de quebra de ATP (fonte energética celular) (FEUGANG et al., 2004).

Estes radicais livres são os mais importantes oxidantes biológicos, pois são potentes eletrófilos que agem em centros nucleofílicos, com terminações  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$  e grupos  $-\text{SH}$ , de pequenos componentes e macromoléculas celulares (DNA, proteínas e polissacarídeos), causando conseqüências irreversíveis, como a morte celular (apoptose ou necrose) (KNAPEN et al., 1999). A concentração intracelular das ROS é aumentada nos sistemas de cultivo *in vitro*, onde elevadas quantidades de  $\text{O}_2^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  foram detectadas (FEUGANG et al., 2004).

Está bem conhecido que as concentrações de  $\text{O}_2$  no lúmen do trato reprodutivo feminino estão entre um terço (3 a 9%) do encontrado nas condições *in vitro* (MASTRIOANNI e JONES, 1965). O cultivo de embriões com alta tensão de oxigênio *in*

*vitro* (20%) pode produzir mais radical livre (FOWLER e CALLINGHAM, 1978) do que em embriões cultivados com 5 ou 7% de O<sub>2</sub> (NASR-ESFAHANI et al., 1990; LIU e FOOTE, 1995).

Parece que o balanço entre a produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e sua “limpeza” é um importante fator para a aquisição da habilidade da fecundação *in vitro* (DE LAMIRANDE et al., 1997). Parece que embriões cultivados *in vitro* que são expostos ao estresse oxidativo têm seu mecanismo de defesa insuficiente para proteger sua delicada estrutura celular (ALI et al., 2003). Efeitos de radicais livres derivados do oxigênio durante o cultivo *in vitro* têm sido demonstrados em muitas espécies. Tem sido demonstrado que as ROS induzem disfunção mitocondrial, danos ao DNA, RNA e proteínas (COMPORTI, 1989) bem como inibição da fusão espermatozóide-oócito (AITKEN et al., 1993). Para proteger o oócito e os embriões do estresse oxidativo durante o cultivo, muitos antioxidantes podem ser adicionados ao meio de cultivo.

Glutathiona (GSH) é um antioxidante natural presente em ambos os gametas, mas em níveis variáveis. O aumento nas concentrações intracelulares de GSH é mostrado em oócitos que progridem da fase de vesícula germinativa para metáfase II, mas a GSH é baixa em zigotos fecundados no estágio pró-nuclear quando comparados com oócitos maduros (CALVIN et al., 1986; PERREAULT et al., 1988; FUNAHASHI et al., 1995; MIYAMURA et al., 1995). Entretanto, a GSH possui um importante papel na proteção da célula contra os danos oxidativos (DE MATOS e FURNUS, 2000). Os níveis de GSH encontrados no oócito no final da maturação são considerados bons marcadores bioquímicos da viabilidade oocitária (ABEYDEERA et al., 1998).

DE MATOS et al. (1996) demonstraram que a adição de cisteamina, cisteína e β-mercaptoetanol ao meio de maturação aumentaram a síntese de GSH no oócito bovino durante a MIV. Este aumento no conteúdo da GSH supre os oócitos maturados *in vitro* de um grande estoque de GSH disponível para proteção do embrião até o estágio de blastocisto (TELFORD et al., 1990; DE MATOS et al., 1995, 1996), melhorando a eficiência da produção *in vitro* de blastocistos de oócitos imaturos.

O precursor da GSH em oócitos é a cisteína (DE MATOS e FURNUS, 2000), que pode ter um papel importante como antioxidante quando suplementado em sistemas de

cultivo. A GSH é o maior composto sulfídrico não proteico em células de mamíferos e serve como reservatório de cisteína (MEISTER e TATE, 1976).

DE MATOS et al. (1995; 1996) demonstraram que a suplementação do meio de MIV com cisteamina aumentou o conteúdo intracelular de GSH em oócitos bovinos e melhorou o desenvolvimento e qualidade dos embriões, produzindo mais embriões que atingiram o estágio de blastocisto no dia 6 do que embriões produzidos em meio de maturação sem suplementação.

Proteger embriões contra o estresse oxidativo parece ser uma das chaves em melhorar o desenvolvimento. Tem sido demonstrado que o desenvolvimento de embriões bovinos foi promovido pelo uso do  $\beta$ -mercaptoetanol, um composto tiol de baixo peso molecular usado como agente redutor em meios de cultivo (TAKAHASHI et al., 1993). O efeito do  $\beta$ -mercaptoetanol na maturação oocitária e no desenvolvimento embrionário está correlacionado com a biosíntese intracelular de GSH (TAKAHASHI et al., 1993; DE MATOS et al., 1996; DE MATOS e FURNUS, 2000).

### **Apoptose**

A apoptose é a forma mais generalizada de morte celular, pois é a que ocorre tanto no desenvolvimento embrionário-fetal como ao longo da vida adulta. O conceito revolucionário de morte celular por apoptose, contrastando com o de necrose, foi proposto há 26 anos por (KERR e SEARLE, 1972): “As células fisiologicamente indesejáveis não necrosam, elas apoptosam”. A morte celular programada é característica no desenvolvimento de animais e plantas. Esse tipo de morte celular é tão importante quanto o processo mitótico no sentido de produzir um indivíduo.

Na apoptose há diminuição do tamanho celular e condensação do núcleo. Os conteúdos nuclear e citoplasmático se fragmentam no fim do processo originando os corpos apoptóticos. Esses restos são fagocitados por células vizinhas do mesmo tipo ou por macrófagos. A condensação da cromatina na periferia do núcleo é consequência do colapso da cromatina resultante do descolamento das alças cromossômicas da lâmina nuclear que se desintegram na apoptose (OBERHAMMER et al., 1993).

A apoptose é caracterizada por uma série de eventos bioquímicos e morfológicos observados no núcleo e no citoplasma das células que entram neste processo. A condensação e fragmentação do DNA nuclear estão comumente associadas à quebra do DNA nuclear em fragmentos de 200 pares de base. Similarmente, o citoplasma se torna denso e com corpos apoptóticos e vesícula, e é observado ainda, peroxidação lipídica e oxidação de proteínas e aumento do retículo endoplasmático (HALL, 1999). É confirmada *in situ* por meio do ensaio TUNEL, que a enzima terminal “deoxynucleotidyl transferase” (TdT) catalisa a incorporação de “biotinylated deoxyuridine” (dUTP) nos locais de quebra de DNA. O sinal é amplificado por fluorescência. A reação TUNEL preferencialmente detecta células que iniciaram o processo de morte celular. A apoptose é observada em condições normais no desenvolvimento de embriões *in vivo* e *in vitro* do início do desenvolvimento de embriões (NEUBER et al., 2002). O índice de células em apoptose pode indicar a qualidade de blastocistos produzidos.

A relação entre o desenvolvimento embrionário e danos ao DNA pode ser medida pela técnica do Cometa. O ensaio Cometa é baseado no princípio que danos ao DNA reduzem o tamanho de fragmentos do DNA. Este efeito é detectado aplicando um campo eletroforético para lisar as células. Os fragmentos de DNA corados formam um típico padrão de migração semelhante a um cometa (HELMA e UHL, 2000). A detecção de danos aos fragmentos de DNA pelo ensaio Cometa é um método proveitoso para avaliar o estresse oxidativo ou outras condições de cultivo embrionário que podem comprometer o desenvolvimento embrionário. O ensaio Cometa, que pode detectar danos ao DNA de células individuais, permite a quantificação de danos ao DNA tanto pelo monitoramento da frequência de danos do DNA como pela extensão (TAKAHASHI et al., 2000).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEYDEERA, L.R.; WANG, W.H.; CANTLEY, T.C.; PRATHER, R.S.; DAY, B.N. Presence of  $\beta$ -mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocyst development after *in vitro* fertilization. **Theriogenology**, v. 50, p. 747-756, 1998.

AITKEN, R.J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 257-265, 1993.

ALI, A.A.; BILODEAU, J.F.; SIRARD, M.A. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, v. 59, p. 939-949, 2003.

ARAKI, K.; NAITO, K.; HARAGUCHI, S.; SUZUKI, R.; YOKOYAMA, M.; INOUE, M.; AIZAWA, S.; TOYODA, Y.; SATO, E. Meiotic abnormalities of *c-mos* knockout mouse oocytes: activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1315-1324, 1996.

AVERY, B.; HAY-SCHMIDT, A.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Embryo development, oocyte morphology, and kinetics of meiotic maturation in bovine oocytes exposed to 6-dimethylaminopurine prior to *in vitro* maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 50, p. 334-344, 1998.

BATTERIDGE, K.J. Phylogeny, ontogeny and embryo transfer. **Theriogenology**, v. 44, p. 1061-1098, 1995.

BISHOP, D.W. Oxygen concentration in the rabbit genital tract. In: BISHOP D.W., editor. **Proceedings of the International Congress of Animal Reproduction and Physiology**. London: Brown, Knight and Truscott, 1956. p. 53-58.

BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J. **Dinámica folicular ovárica en el bovino**. In: Controle Farmacológico do Ciclo Estral em Ruminantes. São Paulo: Fundação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, 2000. p. 12-34.

BORNSLAEGER, E.A.; MATTEI, P.; SCHULTZ, R.M. Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation. **Developmental Biology**, v. 114, p. 453-462, 1986.

CAAMAÑO, J.N.; RYOO, Z.Y.; THOMAS, J.A. Youngs CR  $\beta$ -mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine *in vitro*-matured/*in vitro* fertilised embryos. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1179-1184, 1996.

CALVIN, H.I.; GROSSHAN, K.; BLAKE, E.J. Estimation and manipulation of glutathione levels in prepuberal mouse ovaries and ova: relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. **Gamete Research**, v. 14, p. 265-275, 1986.

CHERR, G.N.; DROBNIS, E.Z.; KATZ, D.F. Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. **Journal of Experimental Zoology**, v. 246, p. 81-93, 1988.

COMPORTI, M. Three models of free radical induced cell injury. **Chemistry and Biology Interact**, v. 72, p. 1-56, 1989.

CROSBY, I.M.; OSBORN, J.C.; MOOR, R.M. Changes in protein phosphorylation during the maturation of mammalian oocytes *in vitro*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 229, p. 459-466, 1984.

DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48-54, 1997.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology**, v. 53, p. 761-771, 2000.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F.; BALDASSARRE, H. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, p. 432-436, 1995.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F.; MARTINEZ, A.G.; MATKOVIC, M. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 451-457, 1996.

DONAHUE, R.P. Maturation of mouse oocyte *in vitro*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 169, p. 237-250, 1968.

EPPIG, J.; O'BRIEN, M.; WIGGLEWORTH, K. Mammalian oocyte growth and development *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 44, p. 260-273, 1996.

FEUGANG, J.M.; DE ROOVER, R.; MOENS, A.; LÉONARD, S.; DESSY, F.; DONNAY, I. Addition of  $\beta$ -mercaptoethanol or Trolox® at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. **Theriogenology**, v. 61, p. 71-90, 2004.

FISSORE, R.A.; HE, C.L.; VANDLE, W.G.F. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1261-1270, 1996.

FOWLER, C.J.; CALLINGHAM, B.A. Substrate-selective activation of rat liver mitochondrial monoamine oxidase by oxygen. **Biochemistry Pharmacological**, v. 2, p. 1995-2000, 1978.

FUNAHASHI, H.; STUMPF, T.T.; CANTELY, T.C.; KIN, N.H.; DAY, B.N. Pronuclear formation and intracellular glutathione content of *in vitro* matured porcine oocytes following *in vitro* fertilization and/or electrical activation. **Zigote**, v. 3, p. 273-281, 1995.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. p. 30-142.

GOSDEN, R.; KRAPEZ, J.; BRIGGS, D. Growth and development of the mammalian oocyte. **BioEssays**, v. 19, p. 875-882, 1997.

HALL, A.G. The role of glutathione in the regulation of apoptosis. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 29, p. 238-245, 1999.

HE, C.L.; DAMIANI, P.; PARYS, J.B.; FISSORE, R.A. Calcium, calcium release receptors, and meiotic resumption in bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1245-1255, 1997.

HELMA, C.; UHL, M. A public domain image-analysis program for the single-cell gel-electrophoresis (comet) assay. **Mutation Research**, v. 466, p. 9-15, 2000.

HYSLOP, P.A.; HINSHAW, D.B.; HALSEY, W.A.Jr.; SCHRAUFSTATTER, I.U.; SAUERHEBER, R.D.; SPRAGG, R.G.; JACKSON, J.H.; COCHRANE, C.G. Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 1665-1675, 1988.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 23-32, 1997.

KASTROP, P.M.M.; BEVERS, M.M.; DESTREE, O.H.J.; KRUIP, T.A.M. Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns during bovine oocyte maturation *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 305-310, 1990.

KASTROP, P.M.M.; HULSHOF, S.C.J.; BEVERS, M.M.; DESTREE, O.H.J.; KRUIP, T.A.M. The effects of amanitin and cycloheximide on nuclear progression, protein synthesis, and phosphorylation during bovine oocyte maturation *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 28, p. 249-254, 1991.

KERR, J.F.; SEARLE, J. The digestion of cellular fragments within phagolysosomes in carcinoma cells. **Journal of Pathology**, v. 108, p. 55-8, 1972.

KITAGAWA, M.; OKABE, T.; OGINO, H.; MATSUMOTO, H.; SUZUKI-TAKAHASHI, I.; KOKUBO, T.; HIGASHI, H.; SAITOH, S.; TAYA, Y.; YASUDA, H.; OHBA, Y.; NISHIMURA, S.; TANAKA, N.; OKUYAMA, A. Butyrolactone I, a selective inhibitor of cdk2 and cdc2 kinase. **Oncogene**, v. 8, p. 2425-2432, 1993.

KITAGAWA, M.; HIGASHI, H.; SUZUKI-TAKAHASHI, I.; OKABE, T.; OGINO, H.; TAYA, Y.; NISHIMURA, S.; OKUYAMA, A. A cyclin-dependent kinase inhibitor butyrolactone I, inhibits phosphorylation of RB protein and cell cycle progression. **Oncogene**, v. 9, p. 2549-2557, 1994.

KNAPEN, M.F.C.M.; ZUSTERZEEL, P.L.M.; PETERS, W.H.M.; STEEGERS, A.P. Glutathione and glutathione related enzymes in reproduction: a review. **European Journal of Obstetrics Gynecology Reproductive Biology**, v. 82, p. 171-84, 1999.

KNOCKAERT, M.; GREENGARD, P.; MEIJER, L. Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. **Trends in Pharmacological Science**, v. 23, p. 417-425, 2002.

KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biological Medicine**, v. 26, p. 463-471, 1999.

KUBELKA, M.; MOTLIK, J.; SCHULTZ, R.M.; PAVLOK, A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 292-302, 2000.

KUBIAK, J.Z. Mouse oocytes gradually develop the capacity for activation during the metaphase II arrest. **Developmental Biology**, v. 136, p. 537-545, 1989.

LABBÉ, J.C.; PICARD, A.; PEAUCELLIER, G.; CAVADORE, J.C.; NURSE, P.; DORÉE, M. Purification of MPF from starfish: Identification as the H 1 histone kinase p34<sup>cdc2</sup> and a possible mechanism for its periodic activation. **Cell**, v. 57, p. 253-263, 1989.

LI, J.; FOOTE, R.H. Culture of rabbit zygotes into blastocysts in protein-free medium with 1-20% O<sub>2</sub>. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 163-167, 1993.

LIM, J.M.; LIOU, S.S.; HANSEL, W. Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of  $\beta$ -mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 46, p. 429-439, 1996.

LIM, J.M.; REGGIO, B.C.; GODKE, R.A.; HANSEL, W. Development of in vitro derived bovine embryos cultured in 5% CO<sub>2</sub> in air or in 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>. **Human Reproduction**, v. 14, p. 458-464, 1999.

LIU, Z.; FOOTE, R.H. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O<sub>2</sub>. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 786-790, 1995.

LOHKA, M.J.; HAYES, M.K.; MALLER, J.L. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, p. 3009-3013, 1988.



LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M.P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, p. 48-53, 1994.

LONERGAN, P.; KHATIR, H.; CAROLAN, C.; MERMILLOD, P. Bovine blastocyst production *in vitro* following inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, p. 355-365, 1997.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; KHATIR, H.; CESARONI, G.; MERMILLOD, P. Effect of protein synthesis inhibition before or during *in vitro* maturation on subsequent development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 50, p. 417-431, 1998.

MAAS, D.H.A.; STOREY, B.T.; MASTROIANNI Jr, L. Oxygen tension in the oviduct of the rhesus monkey. **Fertility and Sterility**, v. 27, p. 1312-1317, 1976.

MASTROIANNI Jr, L.; JONES, R. Oxygen tensions in the rabbit fallopian tube. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 9, p. 99-102, 1965.

MASUI, Y.; CLARKE, H.J. Oocyte maturation. **International Review of Cytology**, v. 57, p. 182-282, 1979.

MEIJER, L. Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. **Trends Cell Biology**, v. 6, p. 393-397, 1996.

MEIJER, L.; KIM, S.H. Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. **Methods in Enzymology**, v. 283, p. 113-128, 1997.

MEISTER, A.; TATE, S.S. Glutathione and the related  $\gamma$ -glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. **Annual Review of Biochemistry**, v. 45, p. 559-604, 1976.

MERMILLOD, P.; TOMANEK, M.; MARCHAL, R.; MEIJER, L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 89-95, 2000.

MINGOTI, G.Z. **Esteroidogênese por células da granulosa em co-cultivo com oócitos bovinos. Efeito de esteróides na maturação (MIV) e fertilização *in vitro* (FIV)**. 1995. 111p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1995.

MIYAMURA, M.; YOSHIDA, M.; HAMANO, S.; KUWAYAMA, M. Glutathione concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 43, pp. 282, 1995 (abstract).

MOTLIK, J.; FULKA, J. Breakdown of germinal vesicle in pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 198, p. 155-162, 1976.

MOTLIK, J.; KOEFOED-JOHNSEN, H.H. FULKA, J. Breakdown of germinal vesicle in bovine oocytes cultivated *in vitro*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 205, p. 377-384, 1978.

MOTLIK, J.; LIE, B.; SHIOYA, Y. Two sensitivity levels of cattle oocytes of puromycin. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 994-998, 1990.

MOTLIK, J.; PAVLOK, A.; KUBELKA, M.; KALOUS, J.; KALAB, P. Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocyte. **Theriogenology**, v. 49, p. 461-469, 1998.

NASR-ESFAHANI, M.H.; AITKEN, J.R.; JOHNSON, M.H. Hydrogen peroxide levels in mouse oocyte and early cleavage stages embryos developed *in vitro* or *in vivo*. **Development**, v. 109, p. 501-507, 1990.

NEUBER, E.; LUETJENS, C.M.; CHAN, A.W.S.; SCHATTEEN, G.M. Analysis of DNA fragmentation of *in vitro* cultured bovine blastocysts using TUNEL. **Theriogenology**, v. 57, p. 2193-2202, 2002.

NODA, Y.; GOTO, Y.; UMAOKA, Y.; SHIOTANI, M.; NAKAYAMA, T.; MORI, T. Culture of human embryos in alpha modification of Eagle's medium under low oxygen tension and low illumination. **Fertility and Sterility**, v. 62, p. 1022-1027, 1994.

OBERHAMMER, F.; BURSCHE, W.; TIEFENBACHER, R.; FROSCHL, G.; PAVELKA, M.; PURCHIO, T.; SCHULTE-HERMANN, R. Apoptosis is induced by transforming growth factor-beta 1 within 5 hours in regressing liver without significant fragmentation of the DNA. **Hepatology**, v. 18, p. 1238-46, 1993.

PERREAULT, S.D.; BARBEE, R.R.; SALOTT, V.I. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. **Developmental Biology**, v. 125, p. 181-186, 1988.

PINCUS, G.; ENZMANN, E. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. I. The activation of ovarian eggs. **Journal of Experimental Medicine**, v. 62, p. 665-675, 1935.

PONDERATO, N.; LAGUTINA, I.; CROTTI, G.; TURINI, P.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Bovine oocytes treated prior to *in vitro* maturation with a combination of butyrolactone I and roscovitine at low doses maintain a normal development capacity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, p. 579-585, 2001.

RICHARD, F.J.; FORTIER, M.A.; SIRARD, M.A. Role of the cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase in the control of meiotic resumption in bovine oocytes cultured with theca cell monolayers. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 1363-1369, 1997.

SAEKI, K.; NAGAO, Y.; KISHI, M.; NAGAI, M. Developmental capacity of bovine oocytes following inhibition of meiotic resumption by cycloheximide or 6-dimethylaminopurine. **Theriogenology**, v. 48, p. 1161-1172, 1997.

SIRARD, M.A.; FLORMAN, H.M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; BARNES, F.L.; SIMS, M.L.; FIRST, N.L. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 40, p. 1257-1263, 1989.

TAKAHASHI, M.; NAGAI, T.; HAMANO, S.; KUWAYAMA, M.; OKAMURA, N.; OKANO, A. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 228-232, 1993.

TAKAHASHI, M.; KEICHO, K.; TAKAHASHI, H.; OGAWA, H.; SCHULTZ, R.M.; OKANO, A. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in *in vitro* cultured bovine embryos by comet assay. **Theriogenology**, v. 54, p. 137-145, 2000.

TELFORD, N.A.; WATSON, A.J.; SCHULTZ, G.A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Molecular Reproduction and Development**, v. 26, p. 90-100, 1990.

TSAFRIRI, A. The control of meiotic maturation in mammals. In: METZ, C.; MONROY, A. **Biology of Fertilization**. New York: Academic Press, 1985. v. 1, p. 221-252.

WASSARMAN, P.M.; ALBERTINI, D.F. The mammalian ovum. KNOBILL, E; NEIL, J.D. **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven, 1994. v. 1, p. 79-122.

WATSON, A.J.; WATSON, P.H.; WARNES, D.; *et al.* Preimplantation development of *in vitro*-matured and *in vitro*-fertilized ovine zygotes: comparison between coculture on oviduct epithelial cell monolayers and culture under low oxygen atmospheres. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 715-724, 1994.

WU, B.; IGNOTZ, G.G.; CURRIE, W.B.; YANG, X. Temporal distinctions in the synthesis and accumulation of proteins by oocytes and *cumulus* cells during maturation *in vitro* of bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 560-565, 1996.

YANG, X.; KUBOTA, C.; SUZUKI, H.; TANEJA, M.; BOLS, P.E.J.; PRESICCE, G.A. Control of oocyte maturation in cows – Biological factors. **Theriogenology**, v. 49, p. 471-482, 1998.

## **CAPÍTULO 2 – MATURAÇÃO NUCLEAR, DISTRIBUIÇÃO DE GRÂNULOS CORTICAIS E CONCENTRAÇÃO INTRAOCITÁRIA DE GLUTATIONA EM OÓCITOS TRATADOS COM INIBIDORES DA MATURAÇÃO NUCLEAR E ANTIOXIDANTES**

**RESUMO** – A maturação oocitária é marcada pela retomada da primeira divisão da meiose com progressão do estágio de vesícula germinativa (VG) da prófase I até a metáfase II (MII). Nesta fase ocorrem todos os eventos necessários para que o oócito expresse seu potencial máximo de desenvolvimento após a fecundação. Os inibidores de maturação nuclear, butirolactona I e roscovitina, mantêm os oócitos bovinos no estágio de VG de maneira reversível. Os antioxidantes (cisteamina e  $\beta$ -mercaptoetanol) protegem as células do estresse oxidativo nos meios de cultivo. Objetivou-se avaliar os efeitos da butirolactona I, roscovitina, cisteamina e  $\beta$ -mercaptoetanol sobre a maturação nuclear e citoplasmática *in vitro* de oócitos bovinos e sobre a concentração intracelular de glutathione [GSHi] desses oócitos. Para avaliar o bloqueio meiótico e a cinética da maturação nuclear oócitos foram corados com Mowiol-Hoechst após 8, 16 e 24 horas do início de MIV. Ao final das 24 horas de cultivo, os oócitos de todos os grupos apresentaram taxas esperadas de M II variando de 73,42 a 85,36% ( $P>0,05$ ), demonstrando que a retomada da meiose foi reversível nos grupos pré-maturados com inibidores. A maturação citoplasmática foi avaliada pela distribuição dos GC pela coloração FITC-LCA após 16 e 24 horas de MIV, apresentando maior porcentagem ( $P<0,05$ ) dos oócitos maduros (78,52 – 82,92%) nos grupos pré-maturados com roscovitina em comparação com os demais grupos, variando de 52,07 a 66,17%. Para avaliar o estresse oxidativo do meio, mensuramos a [GSHi] dos oócitos com 24 horas de MIV, sendo que o grupo SFB obteve a maior concentração (3,66 pmol/oócito;  $P<0,05$ ). A butirolactona I é capaz de bloquear a maturação meiótica de maneira reversível e mais eficiente que a roscovitina, e a presença dos antioxidantes cisteamina e  $\beta$ -mercaptoetanol não interferiu na retomada da maturação nuclear.

**Palavras-Chave:** Maturação *in vitro*, oócito, bovino, grânulos corticais, glutathione

## Introdução

A maturação compreende todos os eventos que permitem ao oócito expressar seu potencial máximo de desenvolvimento após a fecundação. Durante a maturação, os oócitos sofrem várias alterações nucleares e citoplasmáticas. Os eventos nucleares incluem: quebra da vesícula germinativa (GVBD), desaparecimento do nucléolo, condensação da cromatina, extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico, enquanto os eventos citoplasmáticos incluem: redistribuição das organelas intracelulares (mitocôndrias migram para posição perinuclear e grânulos corticais depositam-se abaixo da membrana vitelina) e maturação dos mecanismos de liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  (revisado por HE et al., 1997). Sabe-se que grânulos corticais (GC) são grânulos secretores, cujo exsudato é capaz de alterar a função e promover o endurecimento da zona pelúcida (CHERR et al., 1988).

Apenas a maturação nuclear do oócito não é suficiente para resultar no subsequente desenvolvimento embrionário. A maturação nuclear e a citoplasmática são consideradas importantes para o desenvolvimento embrionário normal após a fertilização (YANG et al., 1998). Pode-se hipotetizar que a competência para o desenvolvimento de oócitos maturados *in vitro* aumente se estes oócitos forem mantidos no estágio de vesícula germinativa (VG), permitindo uma oportunidade adicional para que a maturação citoplasmática ocorra (RODRIGUEZ e FARIN, 2004). Tentativas têm sido feitas com o intuito de manter a meiose estacionada com estabilização farmacológica (realizada pelo cicloheximide, 6-dimetilaminopurina, butirolactona I, roscovitina) ou com inibidores fisiológicos (células da teca) (RICHARD et al., 1997; SAEKI et al., 1997; AVERY et al., 1998; KUBELKA et al., 2000; MERMILLOD et al., 2000). A roscovitina é uma purina conhecida especificamente por inibir a atividade da MPF cinase em numerosos sistemas celulares, mantém oócitos bovinos no estágio de vesícula germinativa (MERMILLOD et al., 2000) e é um inibidor seletivo das cinases dependentes de ciclinas cdk 1, 2 e 5 (KNOCKAERT et al., 2002). Butirolactona I é um dos compostos que funcionam como um potente, específico e reversível inibidor da quebra da vesícula germinativa (GVBD). Esta molécula age como um inibidor

competitivo do ATP, é um inibidor potente e específico de cinases dependente de ciclinas (cdks), e tem algum efeito inibitório em outras proteínas cinases como a MAPK (KITAGAWA et al., 1993; 1994; MOTLIK et al., 1998).

Todavia, a utilização de um sistema duplo de cultivo de oócitos (pré-maturação com inibidores seguido de maturação), implica na manutenção dos oócitos em cultivo por período de tempo mais prolongado que o habitual, expondo-os à prováveis efeitos deletérios que podem ser oriundos do sistema de cultivo, como por exemplo as elevadas concentrações de oxigênio ( $O_2$ ). Em sistemas de cultivo *in vitro*, o estresse oxidativo ocorre quando o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) ultrapassa a capacidade antioxidante do sistema. A alta concentração de  $O_2$  atmosférico induz a geração de radicais livres que são produzidos por várias vias metabólicas e enzimas do oócito, embrião ou das células foliculares (células do *cumulus*) co-cultivadas com estes (NASR-ESFAHANI et al., 1990). Para proteger o oócito e os embriões do estresse oxidativo durante o cultivo, antioxidantes podem ser adicionados ao meio de cultivo. Glutathione (GSH) é um antioxidante natural presente em ambos os gametas, mas em níveis variáveis. Os níveis de GSH encontrados no oócito no final da maturação são considerados bons marcadores bioquímicos da viabilidade oocitária (ABEYDEERA et al., 1998).

Indubitavelmente, muitos fatores biológicos agem de forma conjunta para preparar o oócito imaturo para um desenvolvimento bem sucedido e um embrião competente depois da fecundação. Defeitos na maturação oocitária podem, possivelmente, serem causados por uma inadequada maturação nuclear ou citoplasmática, ou mesmo por uma falha em ambas (YANG et al., 1998). A compreensão exata das necessidades metabólicas do oócito em sistemas de cultivo de maturação *in vitro* pressupõe a necessidade de novas pesquisas até que seja estabelecida a condição ideal para que o maior número possível de oócitos maturados *in vitro* adquira a competência de desenvolvimento e torne-se hábil para sustentar o desenvolvimento inicial do embrião.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a cinética da maturação nuclear e citoplasmática (avaliada pela migração dos grânulos corticais) e produção de glutathione

de oócitos maturados com inibidores da maturação nuclear e antioxidantes durante a inibição da maturação nuclear e após a sua reversão.

## **Material e Métodos**

### **Obtenção dos oócitos**

Os ovários de bovinos abatidos nos abatedouros de Guararapes-SP e Birigüi-SP foram retirados das carcaças aproximadamente 20 minutos após o abate, mantidos em solução salina estéril a 30-35°C e transportados para o laboratório em caixas térmicas, não excedendo o limite de 6 horas desde o abate até o início das aspirações. As punções foliculares foram realizadas manualmente por meio de agulha de calibre 18-G adaptada a seringa de 20 mL, ambas descartáveis. Todo o material aspirado foi transferido para tubos plásticos de 50 mL e decantado por 15 minutos para seleção dos oócitos.

### **Seleção dos oócitos**

O sedimento foi transferido para placas de poliestireno de 60 mm de diâmetro e avaliado em microscópio estereoscópico. Os oócitos com *cumulus* compacto, possuindo pelo menos 4 camadas de células e de aparência saudável (citoplasma de granulação homogênea) foram selecionados para o cultivo de maturação.

### **Maturação dos oócitos**

Os oócitos selecionados foram lavados duas vezes em meio de lavagem H-199 (meio TCM-199 suplementado com 0,2 mM de piruvato, 20 mM de HEPES, 5 mM de bicarbonato de sódio e 75 µg/mL de amicacina) e uma vez em meio de pré-maturação (meio TCM-199 suplementado com 75 µg/mL de amicacina, 0,3% de BSA e 0,2 mM de piruvato). O meio de pré-maturação foi suplementado com 25 µM de roscovitina ou 100 µM de butirolactona I e 50 µM de β-mercaptoetanol ou 50 µM de cisteamina. Somente foram pré-maturados os oócitos dos grupos contendo inibidores da maturação nuclear. Estes oócitos foram avaliados quanto à cinética de maturação nuclear após 8, 16 e 24

horas do início do pré-cultivo e também avaliados quanto à cinética de maturação citoplasmática após 24 horas de pré-cultivo.

Ao término do cultivo de pré-maturação, os oócitos foram transferidos para placa de cultura contendo meio de maturação B-199 (meio TCM-199, suplementado com 0,2 mM de piruvato, 25 mM de bicarbonato de sódio, 75 µg/mL de amicacina, 1 µg/mL de 17-β estradiol, 0,5 µg/mL de FSH, 100 UI/mL de hCG e 0,6% de BSA) suplementado ou não com 50 µM de β-mercaptoetanol ou 50 µM de cisteamina. Os demais grupos experimentais (sem inibidores da maturação nuclear) foram apenas cultivados em meio de maturação B-199. Os oócitos foram avaliados quanto à cinética de maturação nuclear após 8, 16 e 24 horas de cultivo de maturação, e quanto à cinética de maturação citoplasmática após 16 e 24 horas de cultivo. Também foi mensurada a concentração intracelular de glutathione dos oócitos após 24 horas do cultivo de maturação.

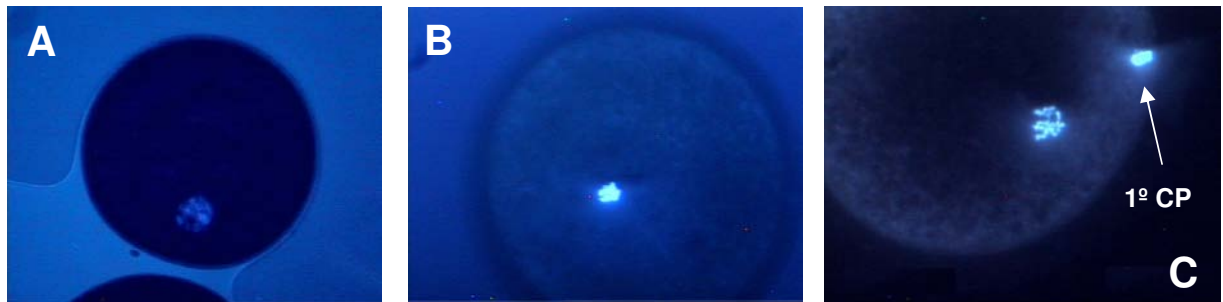
Os oócitos de todos os grupos foram cultivados em microgotas de 100 µL de meio recoberto com óleo mineral, em estufa a 38,8°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar e máxima umidade.

## **Métodos de coloração**

### **Coloração com gel Mowiol-Hoechst**

Os oócitos foram retirados do meio de maturação, colocados em tubos de microcentrífuga com tripsina a 0,1% e levados ao vortex para remoção das células do *cumulus* por 3 a 5 minutos. Os oócitos desnudos foram fixados em solução de formamida 4% durante 5 minutos e em seguida em solução de Triton 1% por 10 minutos. Foram corados em gel Mowiol-Hoechst (10 µg de Hoechst 33342 para 1 mL da solução de gel) entre lâmina e lamínula (HOUSE EAR INSTITUTE, 2001). Para análise quanto aos estádios da meiose (VG, M I e M II), as lâminas foram visualizadas em microscópio equipado com epifluorescência (Microscópio Olympus IX51-III; excitação 330 a 385 nm e emissão 420 nm). A classificação dos oócitos de acordo com as diversas fases da meiose pode ser observada na Figura 1.

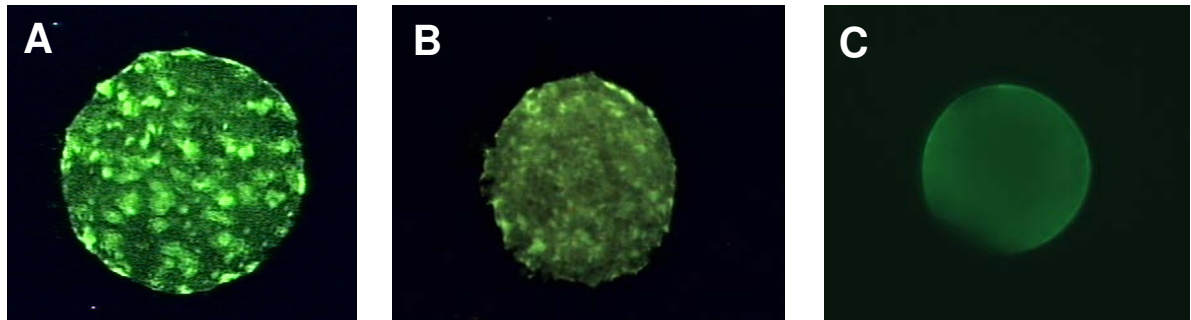




**Figura 1** - Fotomicrografia das diversas fases da maturação nuclear de oócitos bovinos observados sob microscópio de epifluorescência A) Oócitos em VG: cromossomos descondensados; B) Oócitos em M I: cromossomos condensados; C) Oócitos em M II: cromossomos condensados na placa metafásica e no primeiro corpúsculo polar (1° CP).

#### **Coloração de grânulos corticais**

Foi utilizada a metodologia descrita por CHERR et al. (1988) com algumas modificações. A zona pelúcida foi removida por incubação em pronase 0,5% por aproximadamente 5 minutos. Depois, os oócitos foram fixados em solução de formaldeído em PBS a 3% por 30 minutos, e em seguida incubados durante a noite em solução de bloqueio – SB (PBS com 1 mg/mL de BSA, 100 mM de glicina e 0,2% de azida de sódio). Os oócitos foram permeabilizados por 5 minutos em SB acrescida de 0,1% de Triton X-100 e a seguir foram incubados em 10 µg/mL de *Lens culinaris* aglutinina conjugado à isotiocianato de fluoresceína (FITC-LCA; esta lecitina se liga especificamente à  $\alpha$ -D-manose presente nos grânulos corticais) em SB por 15 min. Em seguida, os oócitos foram lavados em SB 3 vezes. As lâminas foram montadas em gel Mowiol-Hoechst e visualizadas em microscópio de epifluorescência (Microscópio Olympus IX51-III; excitação 420 a 460 nm e emissão 515 nm) para avaliação da distribuição dos grânulos corticais no interior dos oócitos. De acordo com o padrão de distribuição dos grânulos corticais, os oócitos foram classificados em três grupos: GC distribuídos em “clusters” – oócito imaturo; GC dispersos (periféricos) e parcialmente em “clusters” – parcialmente maduros; GC periféricos – oócitos maduros (figura 2), de acordo com HOSOE e SHIOYA (1996) e MÉO (2002).



**Figura 2** - Fotomicrografia das diversas fases da maturação citoplasmática de oócitos bovinos observados sob microscópio de epifluorescência A) GC dispostos em “clusters” no interior do oócito (oócito imaturo); B) GC dispostos tanto no centro como na periferia do oócito (oócito parcialmente maturo); C) GC dispostos na periferia do oócito (oócito maturo).

#### **Mensuração da concentração intraocitária de glutathiona dos oócitos maturados**

O protocolo utilizado foi descrito por BROWNE e ARMSTRONG (1998) com algumas adaptações. Após o cultivo de MIV, 30 oócitos de cada tratamento foram desnudados com tripsina 0,1% e depositados em microtubo (500 $\mu$ L) contendo 100  $\mu$ L de solução de extração de ácido meta-fosfórico (SEAM - 1,67 g de ácido meta-fosfórico, 200 mg de EDTA e 30 g de NaCl em 90 mL de H<sub>2</sub>O). Para lise dos oócitos, cada amostra foi agitada com agulha de insulina (29 G “1/2”) e posteriormente estocada em freezer -20°C. Após a colheita de cinco repetições as amostras foram descongeladas e centrifugadas por 4 minutos a 1.500 rpm (540xg) para precipitação dos “debris” celulares. O sobrenadante (100  $\mu$ L) de cada amostra foi transferido individualmente para um tubo de ensaio contendo 2 mL de solução tampão de glutathiona (TG - 0,1 M de fosfato de sódio monobásico e 5 mM de EDTA em 1 L de H<sub>2</sub>O – pH 8,0). Foram adicionados 100  $\mu$ L do reagente o-phthaldialdehyde - OPT (25 mg de OPT em 25 mL de metanol) em cada tubo de ensaio e estes foram incubados por 15 minutos no escuro. As amostras foram lidas em espectrofotômetro (Hitachi – F-2500) ajustado para emissão de fluorescência de 420 nm e excitação de 350 nm. A [GSHi] em pmol de cada amostra foi determinada pela equação da reta obtida da curva padrão da concentração

de GSH. Esta concentração foi dividida pelo número de oócitos presentes em cada amostra para se obter a [GSHi] em pmol por oócito.

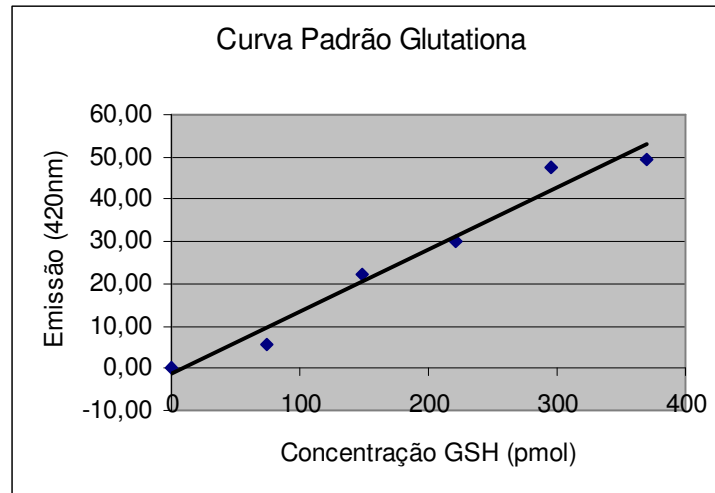
### **Construção da curva padrão da concentração de GSH**

Foi preparada uma solução padrão de GSH (0,10 mg de GSH reduzida por mL de TG). Esta solução padrão foi diluída em água Milli-Q em concentrações decrescentes totalizando 5 amostras (0,05, 0,04, 0,03, 0,02, 0,01 mg/mL de GSH) e uma sem GSH (branco, 0 mg/mL). De cada amostra foram retirados 100 µL e homogeneizados com 1,9 mL de SEAM. Foram retirados 100 µL dessa solução, que foi homogeneizada com 2 mL TG. Em cada tubo foi adicionado 100 µL do reagente OPT, homogeneizado e incubado por exatamente 15 minutos antes da leitura em espectrofotômetro. A leitura foi realizada com emissão de fluorescência de 420 nm e excitação de 350 nm. Foram realizadas cinco repetições para cada amostra padrão. As concentrações das amostras padrão foram convertidas em pmol de GSH. A partir destas concentrações, foi elaborada uma curva padrão, sendo obtida a equação da reta:

$$\text{Equação do gráfico } y = 0,1446x - 0,7374$$

$$x = (y + 0,7374) / 0,1446$$

Sendo: x= concentração da amostra em pmol e y = emissão da amostra em 420 nm



**Figura 3** - Curva padrão de glutaciona.

### **Delineamento experimental**

Os oócitos foram pré-maturados em meio suplementado com 0,3% de BSA e 25  $\mu\text{M}$  de roscovitina ou 100  $\mu\text{M}$  de butirolactona I e 50  $\mu\text{M}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol ou 50  $\mu\text{M}$  de cisteamina. Depois foram maturados em meio B-199 suplementado com 0,6% de BSA e 50  $\mu\text{M}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol ou 50  $\mu\text{M}$  de cisteamina conforme grupos experimentais abaixo:

#### **Pré-Maturação:**

TCM-199 suplementado com 0,3% de BSA + 25  $\mu\text{M}$  de roscovitina (**R**);

TCM-199 suplementado com 0,3% de BSA + 25  $\mu\text{M}$  de roscovitina + 50  $\mu\text{M}$  de cisteamina (**RC**);

TCM-199 suplementado com 0,3% de BSA + 25  $\mu\text{M}$  de roscovitina + 50  $\mu\text{M}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol (**RM**);

TCM-199 suplementado com 0,3% de BSA + 100  $\mu\text{M}$  de butirolactona I (**B**);

TCM-199 suplementado com 0,3% de BSA + 100  $\mu\text{M}$  de butirolactona I + 50  $\mu\text{M}$  de cisteamina (**BC**);

TCM-199 suplementado com 0,3% de BSA + 100  $\mu\text{M}$  de butirolactona I + 50  $\mu\text{M}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol (**BM**);

**Maturação:**

- SEM PRÉ-MIV {
- (S) → B-199 suplementado com 10% de SFB (PADRÃO);
  - (C) → B-199 suplementado com 0,6% de BSA (CONTROLE);
  - (CC) → B-199 suplementado com 0,6% de BSA + 50 µM de cisteamina;
  - (CM) → B-199 suplementado com 0,6% de BSA + 50 µM de β-mercaptoetanol;
- COM PRÉ-MIV {
- (CR) → B-199 suplementado com 0,6% de BSA
  - (CRC) → B-199 suplementado com 0,6% de BSA + 50 µM de cisteamina
  - (CRM) → B-199 suplementado com 0,6% de BSA + 50 µM de β-mercaptoetanol
  - (CB) → B-199 suplementado com 0,6% de BSA
  - (CBC) → B-199 suplementado com 0,6% de BSA + 50 µM de cisteamina
  - (CBM) → B-199 suplementado com 0,6% de BSA + 50 µM de β-mercaptoetanol

**Experimento I: Cinética da Maturação Nuclear**

Os oócitos foram avaliados quanto à cinética da maturação nuclear:

⇒ Pré-maturação (grupos com inibidores de maturação nuclear): 8, 16 e 24 horas do início da pré-maturação pela coloração com gel Mowiol-Hoechst.

⇒ Maturação: 8, 16 e 24 horas do início da maturação pela coloração com gel Mowiol-Hoechst.

**Experimento II: Cinética da Maturação Citoplasmática**

Os oócitos foram avaliados quanto à cinética da maturação citoplasmática:

⇒ Pré-maturação (grupos com inibidores de maturação nuclear): 24 horas do início da pré-maturação pela coloração dos grânulos corticais (GC) com *Lens culinaris* aglutinina conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC-LCA).

⇒ Maturação: 16 e 24 horas do início da maturação pela coloração dos GC com (FITC-LCA).

### **Experimento III: Determinação da Concentração Intraocitária de Glutathione**

Os oócitos foram coletados para a determinação da concentração de glutathione intraocitária utilizando espectrofluorímetro com 24 horas do início da maturação.

#### **Análise Estatística**

Para avaliar o efeito da suplementação do meio de cultura com inibidores da maturação nuclear e antioxidantes sobre a maturação os dados foram analisados pela fração de oócitos cultivados que atingiram os estágios determinados de maturação, reportados em termos de porcentagem (%). Como a porcentagem de oócitos maturados não obteve distribuição normal, os dados foram transformados em  $\arcsin \sqrt{\%}$ . Foi aplicada análise de variância (ANOVA) para comparação dos tratamentos em cada uma das fases de maturação dos oócitos e, posteriormente, foi aplicado teste de Duncan para comparação múltipla das médias.

Para avaliar o efeito da suplementação do meio de cultura com antioxidantes sobre a variável concentração de glutathione intracelular dos oócitos foi realizada ANOVA para comparação dos tratamentos. Posteriormente foi aplicado teste de Duncan para comparação múltipla das médias.

O nível de significância adotado foi de 5%. A análise estatística foi efetuada empregando-se o sistema SAS (Statistical Analysis System).

## **Resultados**

### **Experimento I – Cinética da Maturação Nuclear**

#### **Cultivo de Pré-Maturação**

Após 8 horas do início do cultivo de pré-maturação observou-se que a maioria dos oócitos estava na fase de VG para todos os grupos avaliados. Todavia, foi observada maior porcentagem ( $P < 0,05$ ) de oócitos em VG (94,38 – 97,53%) nos grupos pré-maturados com butirrolactona I, ao passo que uma pequena porcentagem daqueles pré-maturados com roscovitina escapou desta inibição e se encontravam na fase de M I

(11,11 – 26,33%) ( $P < 0,05$ ; Tabela 1). Com 16 horas do início do cultivo de pré-maturação, a maior parte oócitos dos grupos pré-maturados com butirolactona I encontrava-se em VG (93,06 – 96,01%), enquanto que os pré-maturados com roscovitina estavam em M I (19,11 – 30,11%) ( $P < 0,05$ ; Tabela 2). Ao final das 24 horas do cultivo de pré-maturação os oócitos dos grupos pré-maturados com butirolactona I ainda permaneceram em VG (84,15 – 85,85%), mas parte dos oócitos pré-maturados com roscovitina alcançou o estágio de M II (18,57 – 29,11%) ( $P < 0,05$ ; Tabela 3).

**Tabela 1** – Estádio nuclear de oócitos pré-maturados durante 8 horas com inibidores da maturação nuclear (butirolactona I ou roscovitina) e antioxidantes (cisteamina ou  $\beta$ -mercaptoetanol).

Grupos	Oócitos Cultivados	Fase da meiose n (%média $\pm$ EPM)		
		VG	M I	M II
B	67	63 (94,58 $\pm$ 1,76) <sup>ab</sup>	2 (2,56 $\pm$ 1,62) <sup>c</sup>	2 (2,86 $\pm$ 1,84) <sup>a</sup>
BC	79	77 (97,53 $\pm$ 1,56) <sup>a</sup>	2 (2,47 $\pm$ 1,56) <sup>c</sup>	0 (0,00 $\pm$ 0,00) <sup>a</sup>
BM	64	61 (94,38 $\pm$ 2,63) <sup>ab</sup>	3 (5,62 $\pm$ 2,63) <sup>bc</sup>	0 (0,00 $\pm$ 0,00) <sup>a</sup>
R	75	66 (88,89 $\pm$ 3,94) <sup>b</sup>	9 (11,11 $\pm$ 3,94) <sup>b</sup>	0 (0,00 $\pm$ 0,00) <sup>a</sup>
RC	81	59 (73,67 $\pm$ 3,68) <sup>c</sup>	22 (26,33 $\pm$ 3,68) <sup>a</sup>	0 (0,00 $\pm$ 0,00) <sup>a</sup>
RM	73	54 (73,98 $\pm$ 4,09) <sup>c</sup>	18 (24,83 $\pm$ 3,68) <sup>a</sup>	1 (1,19 $\pm$ 1,19) <sup>a</sup>

VG: Vesícula Germinativa; M I: Metáfase I; M II: Metáfase II.

<sup>abc</sup> Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de ANOVA ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 2** – Estádio nuclear de oócitos pré-maturados durante 16 horas com inibidores da maturação nuclear (butirolactona I ou roscovitina) e antioxidantes (cisteamina ou  $\beta$ -mercaptoetanol).

Grupos	Oócitos Cultivados	Fase da meiose n (%média $\pm$ EPM)		
		VG	M I	M II
B	62	57 (93,06 $\pm$ 4,52) <sup>a</sup>	3 (4,17 $\pm$ 2,85) <sup>c</sup>	2 (2,78 $\pm$ 2,78) <sup>a</sup>
BC	75	70 (93,31 $\pm$ 2,73) <sup>a</sup>	5 (6,69 $\pm$ 2,73) <sup>bc</sup>	0 (0,00 $\pm$ 0,00) <sup>a</sup>
BM	60	57 (96,01 $\pm$ 1,80) <sup>a</sup>	2 (2,80 $\pm$ 1,78) <sup>c</sup>	1 (1,19 $\pm$ 1,19) <sup>a</sup>
R	73	54 (75,62 $\pm$ 7,15) <sup>b</sup>	15 (19,11 $\pm$ 4,92) <sup>ab</sup>	4 (5,28 $\pm$ 4,09) <sup>a</sup>
RC	49	30 (62,11 $\pm$ 5,71) <sup>b</sup>	16 (30,11 $\pm$ 3,93) <sup>a</sup>	3 (7,78 $\pm$ 6,54) <sup>a</sup>
RM	77	55 (70,84 $\pm$ 5,59) <sup>b</sup>	17 (22,43 $\pm$ 5,87) <sup>a</sup>	5 (6,73 $\pm$ 3,96) <sup>a</sup>

VG: Vesícula Germinativa; M I: Metáfase I; M II: Metáfase II.

<sup>abc</sup> Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de ANOVA ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 3** – Estádio nuclear de oócitos pré-maturados durante 24 horas com inibidores da maturação nuclear (butirolactona I ou roscovitina) e antioxidantes (cisteamina ou  $\beta$ -mercaptoetanol).

Grupos	Oócitos Cultivados	Fase da meiose n (%média $\pm$ EPM)		
		VG	M I	M II
B	83	71 (85,85 $\pm$ 7,26) <sup>a</sup>	6 (7,09 $\pm$ 3,59) <sup>a</sup>	6 (7,07 $\pm$ 5,38) <sup>b</sup>
BC	65	55 (84,31 $\pm$ 8,19) <sup>a</sup>	7 (11,53 $\pm$ 6,42) <sup>a</sup>	3 (4,17 $\pm$ 4,17) <sup>b</sup>
BM	85	72 (84,15 $\pm$ 9,16) <sup>a</sup>	9 (11,00 $\pm$ 6,00) <sup>a</sup>	4 (4,85 $\pm$ 3,55) <sup>b</sup>
R	79	52 (66,41 $\pm$ 10,98) <sup>ab</sup>	12 (15,02 $\pm$ 5,33) <sup>a</sup>	15 (18,57 $\pm$ 7,20) <sup>ab</sup>
RC	74	44 (58,35 $\pm$ 11,25) <sup>ab</sup>	9 (12,54 $\pm$ 5,12) <sup>a</sup>	21 (29,11 $\pm$ 9,06) <sup>a</sup>
RM	77	42 (54,05 $\pm$ 6,73) <sup>b</sup>	13 (16,87 $\pm$ 5,67) <sup>a</sup>	22 (29,08 $\pm$ 6,03) <sup>a</sup>

VG: Vesícula Germinativa; M I: Metáfase I; M II: Metáfase II.

<sup>ab</sup> Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de ANOVA ( $P < 0,05$ ).

### Cultivo de Maturação

Após 8 horas do início do cultivo de maturação observou-se que os oócitos dos grupos pré-maturados com roscovitina estavam distribuídos nas três fases avaliadas VG (29,56 – 43,25%), M I (22,21 – 27,74%) e M II (34,54 – 42,70%), e que os demais grupos tiveram os oócitos bloqueados em VG (70,84 – 86,86%) ( $P < 0,05$ ; Tabela 4). Com 16 horas do início do cultivo de maturação a maior parte dos oócitos dos grupos sem inibidores de maturação nuclear estava em M I (48,76 – 55,33%), ao passo que a maioria dos oócitos dos grupos pré-maturados com butirolactona I já havia alcançado o estágio de M II (65,64 – 69,79%) e os dos grupos pré-maturados com roscovitina ficaram praticamente distribuídos entre as fases de M I (36,08 – 50,83%) e M II (40,41 – 51,74%; Tabela 5). Ao final das 24 horas do cultivo de maturação, observou-se que a maioria dos oócitos estava na fase de M II (73,42 – 85,36%), para todos os grupos avaliados ( $P > 0,05$ ; Tabela 6), demonstrando que o bloqueio da butirolactona I e roscovitina foi totalmente reversível.



**Tabela 4** – Estádio nuclear de oócitos pré-maturados durante 24 horas com inibidores da maturação nuclear (butirolactona I ou roscovitina) e antioxidantes (cisteamina ou  $\beta$ -mercaptoetanol) seguidos do cultivo de maturação por 8 horas.

Grupos	Oócitos Cultivados	Fase da meiose n (%média $\pm$ EPM)		
		VG	M I	M II
S	81	63 (78,57 $\pm$ 10,27) <sup>a</sup>	18 (21,43 $\pm$ 10,27) <sup>a</sup>	0 (0,00 $\pm$ 0,00) <sup>c</sup>
C	78	67 (86,86 $\pm$ 5,31) <sup>a</sup>	10 (11,97 $\pm$ 4,54) <sup>a</sup>	1 (1,11 $\pm$ 1,11) <sup>bc</sup>
CC	81	64 (80,52 $\pm$ 5,70) <sup>a</sup>	17 (20,12 $\pm$ 6,23) <sup>a</sup>	0 (0,00 $\pm$ 0,00) <sup>c</sup>
CM	86	72 (84,00 $\pm$ 5,71) <sup>a</sup>	13 (14,82 $\pm$ 5,30) <sup>a</sup>	1 (1,19 $\pm$ 1,19) <sup>bc</sup>
CB	80	56 (70,84 $\pm$ 10,05) <sup>a</sup>	19 (22,84 $\pm$ 8,90) <sup>a</sup>	5 (6,32 $\pm$ 3,08) <sup>b</sup>
CBC	65	52 (83,18 $\pm$ 7,00) <sup>a</sup>	9 (11,96 $\pm$ 4,96) <sup>a</sup>	4 (4,87 $\pm$ 2,52) <sup>bc</sup>
CBM	80	64 (80,24 $\pm$ 8,68) <sup>a</sup>	15 (18,57 $\pm$ 7,67) <sup>a</sup>	1 (1,19 $\pm$ 1,19) <sup>bc</sup>
CR	72	30 (43,25 $\pm$ 5,76) <sup>b</sup>	16 (22,21 $\pm$ 5,00) <sup>a</sup>	26 (34,54 $\pm$ 6,31) <sup>a</sup>
CRC	83	32 (38,61 $\pm$ 7,26) <sup>b</sup>	20 (22,68 $\pm$ 4,92) <sup>a</sup>	31 (37,25 $\pm$ 5,43) <sup>a</sup>
CRM	84	24 (29,56 $\pm$ 7,05) <sup>b</sup>	24 (27,74 $\pm$ 8,63) <sup>a</sup>	36 (42,70 $\pm$ 6,09) <sup>a</sup>

VG: Vesícula Germinativa; M I: Metáfase I; M II: Metáfase II.

<sup>abc</sup> Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de ANOVA (P<0,05).

**Tabela 5** – Estádio nuclear de oócitos pré-maturados durante 24 horas com inibidores da maturação nuclear (butirolactona I ou roscovitina) e antioxidantes (cisteamina ou  $\beta$ -mercaptoetanol) seguidos do cultivo de maturação por 16 horas.

Grupos	Oócitos Cultivados	Fase da meiose n (%média $\pm$ EPM)		
		VG	M I	M II
S	69	11 (17,63 $\pm$ 10,90) <sup>a</sup>	38 (52,22 $\pm$ 9,60) <sup>a</sup>	20 (30,15 $\pm$ 9,99) <sup>bc</sup>
C	70	17 (23,69 $\pm$ 6,08) <sup>a</sup>	30 (48,76 $\pm$ 8,72) <sup>a</sup>	18 (27,55 $\pm$ 10,74) <sup>bc</sup>
CC	70	12 (21,67 $\pm$ 8,01) <sup>a</sup>	39 (55,33 $\pm$ 9,55) <sup>a</sup>	18 (23,01 $\pm$ 10,85) <sup>c</sup>
CM	80	11 (13,42 $\pm$ 5,15) <sup>a</sup>	44 (55,01 $\pm$ 6,01) <sup>a</sup>	25 (31,57 $\pm$ 9,77) <sup>bc</sup>
CB	71	8 (11,71 $\pm$ 3,88) <sup>a</sup>	13 (18,50 $\pm$ 4,93) <sup>b</sup>	48 (69,79 $\pm$ 7,20) <sup>a</sup>
CBC	76	11 (13,92 $\pm$ 5,33) <sup>a</sup>	12 (16,31 $\pm$ 4,58) <sup>b</sup>	53 (69,77 $\pm$ 5,65) <sup>a</sup>
CBM	72	9 (12,40 $\pm$ 3,97) <sup>a</sup>	15 (21,96 $\pm$ 6,50) <sup>b</sup>	48 (65,64 $\pm$ 7,16) <sup>a</sup>
CR	72	14 (17,23 $\pm$ 6,07) <sup>a</sup>	24 (36,08 $\pm$ 8,09) <sup>ab</sup>	34 (46,69 $\pm$ 6,06) <sup>abc</sup>
CRC	78	9 (11,24 $\pm$ 3,13) <sup>a</sup>	29 (37,02 $\pm$ 6,05) <sup>ab</sup>	40 (51,74 $\pm$ 6,82) <sup>ab</sup>
CRM	78	7 (8,76 $\pm$ 3,53) <sup>a</sup>	39 (50,83 $\pm$ 7,08) <sup>a</sup>	32 (40,41 $\pm$ 7,77) <sup>abc</sup>

VG: Vesícula Germinativa; M I: Metáfase I; M II: Metáfase II.

<sup>abc</sup> Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de ANOVA (P<0,05).

**Tabela 6** – Estádio nuclear de oócitos pré-maturados durante 24 horas com inibidores da maturação nuclear (butirolactona I ou roscovitina) e antioxidantes (cisteamina ou  $\beta$ -mercaptoetanol) seguidos do cultivo de maturação por 24 horas.

Grupos	Oócitos Cultivados	Fase da meiose n (%média $\pm$ EPM)		
		VG	M I	M II
S	79	0 (0,00 $\pm$ 0,00) <sup>a</sup>	12 (16,55 $\pm$ 5,84) <sup>a</sup>	67 (83,46 $\pm$ 5,84) <sup>a</sup>
C	79	0 (0,00 $\pm$ 0,00) <sup>a</sup>	15 (18,96 $\pm$ 2,99) <sup>a</sup>	64 (81,05 $\pm$ 2,99) <sup>a</sup>
CC	84	2 (2,38 $\pm$ 1,51) <sup>a</sup>	14 (16,52 $\pm$ 2,00) <sup>a</sup>	68 (81,03 $\pm$ 2,08) <sup>a</sup>
CM	79	1 (1,39 $\pm$ 1,39) <sup>a</sup>	14 (18,11 $\pm$ 3,62) <sup>a</sup>	64 (80,50 $\pm$ 4,84) <sup>a</sup>
CB	71	2 (3,27 $\pm$ 2,18) <sup>a</sup>	10 (12,84 $\pm$ 5,02) <sup>a</sup>	59 (83,89 $\pm$ 4,07) <sup>a</sup>
CBC	67	0 (0,00 $\pm$ 0,00) <sup>a</sup>	15 (26,58 $\pm$ 9,64) <sup>a</sup>	52 (73,42 $\pm$ 9,64) <sup>a</sup>
CBM	78	2 (2,47 $\pm$ 1,56) <sup>a</sup>	12 (15,53 $\pm$ 3,57) <sup>a</sup>	64 (82,00 $\pm$ 2,68) <sup>a</sup>
CR	84	1 (1,11 $\pm$ 1,11) <sup>a</sup>	19 (23,58 $\pm$ 5,16) <sup>a</sup>	64 (75,31 $\pm$ 5,12) <sup>a</sup>
CRC	78	1 (1,28 $\pm$ 1,28) <sup>a</sup>	10 (13,35 $\pm$ 3,40) <sup>a</sup>	67 (85,36 $\pm$ 3,77) <sup>a</sup>
CRM	62	2 (2,56 $\pm$ 2,56) <sup>a</sup>	13 (17,54 $\pm$ 6,72) <sup>a</sup>	47 (79,90 $\pm$ 7,57) <sup>a</sup>

VG: Vesícula Germinativa; M I: Metáfase I; M II: Metáfase II.

<sup>abc</sup> Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de ANOVA (P<0,05).

## Experimento II – Cinética da Maturação Citoplasmática

### Cultivo de Pré-Maturação

Os resultados obtidos com 24 horas do início do cultivo de pré-maturação demonstraram que os oócitos pré-maturados com butirolactona I encontraram-se imaturos (38,85 – 49,81%) e parcialmente maduros (32,80 – 40,38%), enquanto que aqueles pré-maturados com roscovitina estavam, na sua maioria, maduros (46,11 – 51,08%) (P<0,05; Tabela 7).

**Tabela 7** – Avaliação da maturação citoplasmática pela distribuição de grânulos corticais em oócitos pré-maturados durante 24 horas com inibidores da maturação nuclear (butirolactona I ou roscovitina) e antioxidantes (cisteamina ou  $\beta$ -mercaptoetanol).

Grupos	Oócitos Cultivados	Distribuição de grânulos corticais n (%média $\pm$ EPM)		
		Imaturo	Parcialmente Maduro	Maduro
0 h	70	34 (48,54 $\pm$ 10,50)	25 (35,32 $\pm$ 4,53)	11 (16,14 $\pm$ 7,28)
B	72	36 (49,45 $\pm$ 11,24) <sup>a</sup>	25 (34,43 $\pm$ 5,79) <sup>a</sup>	11 (16,12 $\pm$ 6,43) <sup>b</sup>
BC	72	35 (49,81 $\pm$ 11,85) <sup>a</sup>	24 (32,80 $\pm$ 8,06) <sup>a</sup>	13 (17,39 $\pm$ 7,20) <sup>b</sup>
BM	63	25 (38,85 $\pm$ 10,71) <sup>a</sup>	26 (40,38 $\pm$ 8,00) <sup>a</sup>	12 (20,77 $\pm$ 8,42) <sup>b</sup>
R	82	17 (21,04 $\pm$ 5,84) <sup>a</sup>	23 (27,89 $\pm$ 3,26) <sup>a</sup>	42 (51,08 $\pm$ 8,22) <sup>a</sup>
RC	72	19 (26,59 $\pm$ 4,31) <sup>a</sup>	17 (25,10 $\pm$ 5,58) <sup>a</sup>	36 (48,32 $\pm$ 9,03) <sup>a</sup>
RM	70	17 (24,15 $\pm$ 5,69) <sup>a</sup>	20 (29,74 $\pm$ 3,21) <sup>a</sup>	33 (46,11 $\pm$ 4,66) <sup>a</sup>

<sup>ab</sup> Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de ANOVA (P<0,05).

### Cultivo de Maturação

Após 16 horas do início do cultivo de maturação observou-se que os oócitos dos grupos sem inibidores de maturação nuclear e daqueles pré-maturados com butirolactona I apresentaram-se imaturos (23,55 -37,53%), parcialmente maduros (25,07 – 35,00%) e maduros (28,62 – 46,96%). A diferença (P<0,05) ocorreu principalmente em relação aos grupos pré-maturados com roscovitina em que a maioria dos oócitos estava maduro (61,15 -71,79%; Tabela 8). Ao final das 24 horas do cultivo de maturação a maior parte dos oócitos estava maduro (52,07 – 82,92%) para todos os grupos avaliados. Porém, os oócitos maturados com SFB tiveram a menor porcentagem de oócitos maduros quando comparados aos demais grupos (P<0,05; Tabela 9).

**Tabela 8** – Avaliação da maturação citoplasmática pela distribuição de grânulos corticais em oócitos pré-maturados durante 24 horas com inibidores da maturação nuclear (butirolactona I ou roscovitina) e antioxidantes (cisteamina ou  $\beta$ -mercaptoetanol) seguidos do cultivo de maturação por 16 horas.

Grupos	Oócitos Cultivados	Distribuição de grânulos corticais n (%média $\pm$ EPM)		
		Imaturo	Parcialmente Maduro	Maduro
S	78	30 (38,43 $\pm$ 5,95) <sup>a</sup>	26 (32,95 $\pm$ 3,03) <sup>a</sup>	22 (28,62 $\pm$ 6,67) <sup>d</sup>
C	81	25 (31,10 $\pm$ 10,07) <sup>abc</sup>	24 (29,88 $\pm$ 5,48) <sup>a</sup>	32 (39,02 $\pm$ 10,21) <sup>bcd</sup>
CC	87	24 (27,43 $\pm$ 5,79) <sup>abc</sup>	31 (34,79 $\pm$ 5,28) <sup>a</sup>	32 (37,79 $\pm$ 8,19) <sup>bcd</sup>
CM	77	18 (23,55 $\pm$ 6,74) <sup>abc</sup>	26 (35,00 $\pm$ 7,25) <sup>a</sup>	33 (41,45 $\pm$ 12,18) <sup>bcd</sup>
CB	70	27 (37,53 $\pm$ 5,07) <sup>a</sup>	19 (27,78 $\pm$ 3,38) <sup>a</sup>	24 (34,69 $\pm$ 3,30) <sup>cd</sup>
CBC	65	22 (27,34 $\pm$ 7,18) <sup>abc</sup>	19 (25,70 $\pm$ 6,00) <sup>a</sup>	24 (46,97 $\pm$ 11,07) <sup>abcd</sup>
CBM	63	19 (30,45 $\pm$ 6,08) <sup>ab</sup>	15 (25,07 $\pm$ 2,87) <sup>a</sup>	29 (44,48 $\pm$ 5,97) <sup>abcd</sup>
CR	83	14 (17,57 $\pm$ 4,96) <sup>abc</sup>	18 (21,28 $\pm$ 3,54) <sup>a</sup>	51 (61,15 $\pm$ 7,00) <sup>abc</sup>
CRC	80	10 (12,09 $\pm$ 5,07) <sup>bc</sup>	16 (19,80 $\pm$ 2,96) <sup>a</sup>	54 (68,12 $\pm$ 7,37) <sup>ab</sup>
CRM	77	8 (10,05 $\pm$ 4,14) <sup>c</sup>	15 (19,45 $\pm$ 5,38) <sup>a</sup>	55 (71,79 $\pm$ 7,13) <sup>a</sup>

<sup>abcd</sup> Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de ANOVA (P<0,05).

**Tabela 9** – Avaliação da maturação citoplasmática pela distribuição de grânulos corticais em oócitos pré-maturados durante 24 horas com inibidores da maturação nuclear (butirolactona I ou roscovitina) e antioxidantes (cisteamina ou  $\beta$ -mercaptoetanol) seguidos do cultivo de maturação por 24 horas.

Grupos	Oócitos Cultivados	Distribuição de grânulos corticais n (%média $\pm$ EPM)		
		Imaturo	Parcialmente Maduro	Maduro
S	60	14 (22,07 $\pm$ 5,35) <sup>a</sup>	15 (25,86 $\pm$ 4,08) <sup>a</sup>	31 (52,07 $\pm$ 3,02) <sup>c</sup>
C	70	15 (21,32 $\pm$ 5,36) <sup>a</sup>	9 (12,78 $\pm$ 1,58) <sup>a</sup>	46 (65,90 $\pm$ 6,70) <sup>abc</sup>
CC	83	13 (15,00 $\pm$ 4,28) <sup>ab</sup>	20 (24,68 $\pm$ 4,11) <sup>a</sup>	50 (60,32 $\pm$ 2,64) <sup>bc</sup>
CM	69	9 (13,87 $\pm$ 4,92) <sup>ab</sup>	17 (21,53 $\pm$ 5,05) <sup>a</sup>	43 (64,60 $\pm$ 7,09) <sup>bc</sup>
CB	73	15 (20,88 $\pm$ 4,42) <sup>a</sup>	10 (12,95 $\pm$ 5,58) <sup>a</sup>	48 (66,17 $\pm$ 8,51) <sup>abc</sup>
CBC	72	14 (20,71 $\pm$ 5,63) <sup>a</sup>	16 (23,85 $\pm$ 6,47) <sup>a</sup>	42 (55,44 $\pm$ 9,37) <sup>bc</sup>
CBM	81	13 (16,63 $\pm$ 5,20) <sup>a</sup>	21 (26,48 $\pm$ 5,21) <sup>a</sup>	47 (56,89 $\pm$ 7,76) <sup>bc</sup>
CR	64	4 (4,85 $\pm$ 3,55) <sup>b</sup>	6 (12,23 $\pm$ 7,94) <sup>a</sup>	54 (82,92 $\pm$ 8,50) <sup>a</sup>
CRC	77	3 (4,05 $\pm$ 1,86) <sup>b</sup>	11 (15,23 $\pm$ 5,41) <sup>a</sup>	63 (80,73 $\pm$ 4,62) <sup>ab</sup>
CRM	80	3 (4,17 $\pm$ 2,85) <sup>b</sup>	14 (17,31 $\pm$ 4,47) <sup>a</sup>	63 (78,52 $\pm$ 4,73) <sup>ab</sup>

<sup>abc</sup> Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de ANOVA (P<0,05).

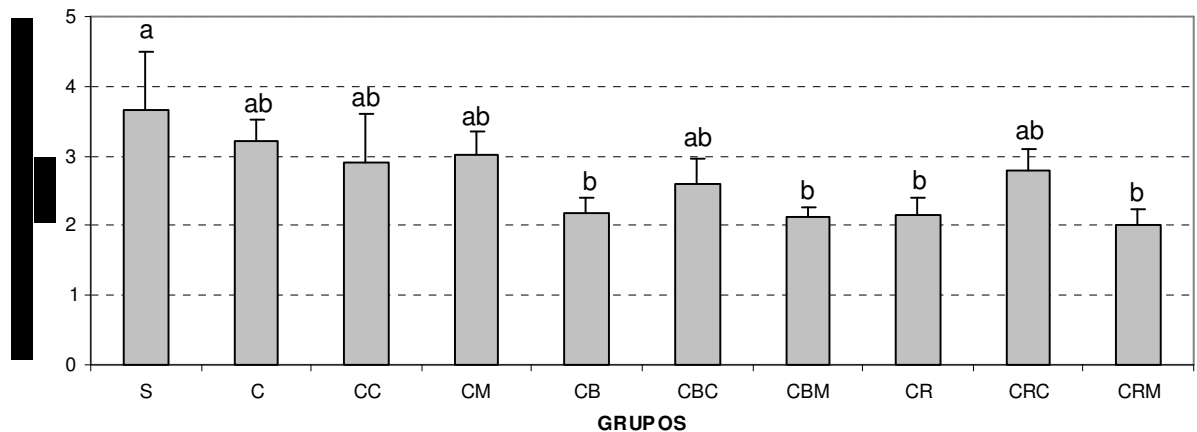
### Experimento III – Determinação da Concentração Intraocitária de Glutathiona

A avaliação da concentração intraocitária de GSH por oócito nos diferentes grupos experimentais demonstrou que oócitos maturados com SFB apresentaram a maior [GSHi] (3,66 pmol) quando comparado aos grupos CB, CBM, CR e CRM (2,18; 2,12; 2,14; 2,00 pmol) respectivamente ( $P < 0,05$ ; Tabela 10 e Figura 4).

**Tabela 10** - Concentração de glutathiona intracelular por oócito submetidos a diferentes condições de maturação por 24 horas.

Grupo	Nº de oócitos	[ ] GSH [média(pmol/oócito) ± EPM]
S	150	3,66 ± 0,85 <sup>a</sup>
C	150	3,20 ± 0,33 <sup>ab</sup>
CC	150	2,91 ± 0,68 <sup>ab</sup>
CM	150	3,02 ± 0,35 <sup>ab</sup>
CB	150	2,18 ± 0,23 <sup>b</sup>
CBC	150	2,61 ± 0,34 <sup>ab</sup>
CBM	150	2,12 ± 0,16 <sup>b</sup>
CR	150	2,14 ± 0,27 <sup>b</sup>
CRC	150	2,78 ± 0,31 <sup>ab</sup>
CRM	150	2,00 ± 0,24 <sup>b</sup>
Total	1500	Média total = 2,66 pmol/oócito

<sup>ab</sup> Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de ANOVA ( $P < 0,05$ ).



**Figura 4** – Concentração de GSH intracelular em oócitos maturados em diferentes meios de cultura por 24 horas.

**S**= SFB (10%), **C**= BSA (0,6%), **CC**= BSA (0,6%) + CIS (50  $\mu$ M), **CM**= BSA (0,6%) +  $\beta$ ME (50  $\mu$ M), **CB**= pré-MIV BSA (0,3%) + B (100  $\mu$ M) / MIV BSA (0,6%); **CBC**= pré-MIV BSA (0,3%) + B (100  $\mu$ M) + CIS (50  $\mu$ M) / MIV BSA (0,6%) + CIS (50  $\mu$ M), **CBM**= pré-MIV BSA (0,3%) + B (100  $\mu$ M) +  $\beta$ ME (50  $\mu$ M) / MIV BSA (0,6%) +  $\beta$ ME (50  $\mu$ M), **CR**= pré-MIV BSA (0,3%) + R (25  $\mu$ M) / MIV BSA (0,6%); **CRC**= pré-MIV BSA (0,3%) + R (25  $\mu$ M) + CIS (50  $\mu$ M) / MIV BSA (0,6%) + CIS (50  $\mu$ M), **CRM**= pré-MIV BSA (0,3%) + R (25  $\mu$ M) +  $\beta$ ME (50  $\mu$ M) / MIV BSA (0,6%) +  $\beta$ ME (50  $\mu$ M).

<sup>ab</sup> Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de ANOVA ( $P < 0,05$ ).

## Discussão

### Experimento I – Cinética da Maturação Nuclear

O cultivo de pré-maturação na presença de inibidores meióticos é uma tentativa de se mimetizar a capacitação oocitária que ocorre *in vivo*. O bloqueio meiótico visa manter os oócitos em estágio de vesícula germinativa (VG) para que os mesmos tenham um tempo adicional para sofrer as modificações que ocorrem antes da maturação propriamente dita (HYTTEL et al., 1997) e adquirir maior competência para o desenvolvimento (KUBELKA et al., 2000; MERMILLOD et al., 2000). Neste sentido, o oócito pode ter a possibilidade de construir, modificar e armazenar novas proteínas sintetizadas e ribonucleoproteínas que podem aumentar a competência de desenvolvimento.

Um dos tratamentos usualmente utilizados é o cultivo de pré-maturação na presença de inibidores de cinases dependentes de ciclinas (CDK) (MERMILLOD et al., 2000; PONDERATO et al., 2001; KUBELKA et al., 2002). A butirolactona I tem demonstrado inibir a retomada da meiose de oócitos bovinos de maneira reversível por 24 horas sem ter um efeito negativo no subsequente estágio de blastocisto (MOTLIK et al., 1998; IMAI et al., 1999; KUBELKA et al., 2000; LONERGAN et al., 2000). Do mesmo modo, a roscovitina tem demonstrado ser efetiva em bovinos (MERMILLOD et al., 2000).

O presente trabalho verificou a cinética da maturação nuclear de oócitos bovinos maturados na presença dos inibidores butirolactona I ou roscovitina, adicionados ou não dos antioxidantes cisteamina ou  $\beta$ -mercaptoetanol. A cinética da maturação nuclear foi observada durante o cultivo de pré-maturação (com os inibidores), e também durante a maturação sem a presença destes inibidores.

Com 8 e 16 horas do cultivo de pré-maturação, observamos que a maioria dos oócitos de todos os grupos encontrava-se no estágio de VG. Entretanto, foi observada maior porcentagem de oócitos em VG nos grupos pré-maturados com butirolactona I, ao passo que uma pequena porcentagem daqueles pré-maturados com roscovitina escapou desta inibição e se encontravam na fase de M I. A roscovitina atua inibindo as cinases específicas dependentes de ciclo celular cdc2, cdk2 e cdk5 (MEIJER et al., 1997); e a butirolactona I atua como inibidor específico das cinases cdk2 e cdc2 (KITAGAWA et al., 1993). Ambas atuam competindo pelo sítio de ligação do ATP dessas cinases (DAMIENS e MEIJER, 2000), e assim podem prevenir a retomada da meiose inibindo a atividade do MPF (KUBELKA et al., 2000; KRISCHEK e MEINECKE, 2001). Esta diferença na atividade inibitória das cinases pode ser explicada por MERMILLOD et al., (2000), que sugeriram que a roscovitina, em baixas doses, pode ser eficiente em inibir a atividade do MPF (assim como a butirolactona I), mas não em inibir a atividade da MAPK, permitindo a retomada da meiose pelos oócitos até o estágio de M I.

As taxas de bloqueio meiótico usando butirolactona I (por 24 horas no cultivo de pré-maturação) neste estudo (85,85%) foram similares aos resultados de ADONA e

LEAL (2004) (97,5%) e de KUBELKA et al. (2000) (89,5%). O bloqueio meiótico com a roscovitina apresentou 66,41% dos oócitos em VG e 18,57% em M II, enquanto que ADONA e LEAL (2004) observaram 79,9% dos oócitos em VG, e MERMILLOD et al. (2000) 83% dos oócitos em VG. Observamos que estes inibidores são efetivos em bloquear a meiose de oócitos bovinos, entretanto a butirolactona I se mostrou mais eficiente neste bloqueio que a roscovitina.

Para verificar a reversibilidade do bloqueio meiótico da roscovitina e da butirolactona I, cultivamos os oócitos pré-maturados por 24 horas por mais 8, 16 e 24 horas na ausência dos inibidores e observamos o estágio de maturação.

Após 8 horas do início do cultivo de maturação, observou-se que os oócitos dos grupos pré-maturados com roscovitina estavam distribuídos nas três fases avaliadas (VG, M I e M II), e que em todos os outros grupos ainda se encontravam na fase de VG. Com 16 horas do início do cultivo de maturação, a maior parte dos oócitos dos grupos sem inibidores de maturação nuclear estava em M I, ao passo que a maioria dos oócitos dos grupos pré-maturados com butirolactona I já havia alcançado o estágio de M II, e os dos grupos pré-maturados com roscovitina ficaram praticamente distribuídos entre as fases de M I e M II. Da mesma maneira que ADONA e LEAL (2004), foi observada uma aceleração da meiose após transferência dos oócitos para meio sem inibidores. Essa aceleração pode ser um padrão do tipo de droga e não um efeito da concentração, pois é observada em diferentes espécies, diferentes inibidores de CDK (butirolactona I, roscovitina e a mistura de ambos) e concentrações diferentes como 10 e 100  $\mu\text{M}$ .

Alguns estudos mostram que o bloqueio da meiose de oócitos não inibe completamente a síntese (MARCHAL et al., 2001) e fosforilação protéicas (VIGNERON et al., 2004) ou a transcrição (LEQUARRE et al., 2004). WU et al. (2002) ainda observaram que a MAPK, embora inibida durante o bloqueio, é rapidamente ativada após a remoção do inibidor. Isso indica que durante o bloqueio pode haver acúmulo de fatores necessários à progressão meiótica.

O efeito dessa aceleração, porém, não parece ser deletério, pois as taxas de desenvolvimento até a fase de blastocisto usando tais tratamentos não foram



prejudicadas (BEKER-VAN WOUDEBERG et al., 2006) e podem até melhorar o desenvolvimento até blastocisto (COY et al., 2005a). Além disso, recentemente foi relatado o nascimento de leitões produzidos *in vitro* a partir de oócitos bloqueados antes da MIV (COY et al., 2005b). O significado da aceleração da meiose ainda não está bem esclarecido.

Com relação à reversibilidade do bloqueio meiótico da butirolactona I ao final do cultivo de maturação, nossos resultados (83,89% dos oócitos em M II) foram semelhantes aos de KUBELKA et al. (2000) (91%) e de LONERGAN et al. (2000) (93,6%). A roscovitina demonstrou-se reversível em 75,31% dos oócitos em M II, entretanto, outros autores observaram que 89% a 96% dos oócitos atingiram o estágio de M II (MERMILLOD et al., 2000; ADONA e LEAL 2004). Os resultados demonstram que os oócitos pré-maturados com estes inibidores de maturação nuclear são capazes de reverter o bloqueio meiótico e retomar a meiose chegando a M II quando retirados do meio de cultivo com inibidores, mas que a butirolactona I é capaz de bloquear a maturação meiótica de maneira reversível e mais eficiente que a roscovitina. A maturação ainda pode ser atingida até mesmo em tempo inferior (16 horas) quando comparados aos oócitos cultivados normalmente.

Observamos também que a presença dos antioxidantes (cisteamina e  $\beta$ -mercaptoetanol) nos meios de pré-maturação e maturação não interferiu na ação da butirolactona I e roscovitina em bloquear e retomar a maturação nuclear, já que os grupos contendo estes antioxidantes se comportaram da mesma maneira que os grupos somente com inibidores. A adição de cisteamina e  $\beta$ -mercaptoetanol ao meio de maturação aumenta a síntese de GSH no oócito bovino durante a MIV (DE MATOS et al. 1996). Devido à sua ação, era esperado que estes antioxidantes não interferissem na inibição da MIV ou na cinética da maturação nuclear pós-inibição.

## **Experimento II – Cinética da Maturação Citoplasmática**

Sabe-se que grânulos corticais (GC) são grânulos secretores, cujo exsudato é capaz de alterar a função e promover o endurecimento da zona pelúcida (CHERR *et al.*, 1988). O padrão de distribuição dos grânulos corticais pode ser utilizado na avaliação

da maturação citoplasmática, já que a maturação citoplasmática está associada às mudanças celulares que ocorrem durante a maturação nuclear e a migração dos grânulos corticais e reposicionamento das mitocôndrias (SIRARD, 2001).

O presente trabalho verificou a cinética da maturação citoplasmática de oócitos bovinos maturados na presença dos inibidores butirolactona I ou roscovitina, adicionados ou não dos antioxidantes cisteamina ou  $\beta$ -mercaptoetanol. A cinética da maturação citoplasmática foi observada ao final do cultivo de pré-maturação, seguido de maturação sem a presença destes inibidores.

Os grânulos corticais nos oócitos imaturos estão distribuídos por todo o citoplasma celular e sua migração para a região periférica do oócito (córtex) ocorre com o avanço da maturação (CONNORS et al., 1998; WESSEL et al., 2001; VELILLA et al., 2004). Nos oócitos bloqueados com butirolactona I por 24 horas não foi constatada migração dos grânulos corticais para o córtex celular, mantendo a mesma distribuição de oócitos imaturos. Estes resultados sugerem que a butirolactona I pode interferir no reposicionamento dos GC bloqueando, também, a maturação citoplasmática. Os oócitos pré-maturados com roscovitina apresentaram, na sua maioria, os GC dispersos na periferia, assim como COY et al., (2005a) que observaram que a utilização de um enantiômero da roscovitina bloqueia a meiose, mas não totalmente a migração de grânulos corticais, já que uma parcela dos oócitos tratados apresentou migração. Entretanto, BARRETTO et al. (2007) sugeriram que o bloqueio meiótico em oócitos bovinos realizado pela roscovitina não influencia na migração de grânulos corticais. Essa contradição pode ser resultado de diferenças nas condições de cultivo, tipo de droga ou de avaliação ou bloqueio menos eficiente.

Analisando os resultados do cultivo de maturação, após 16 horas observou-se que os oócitos dos grupos sem inibidores de maturação nuclear e daqueles pré-maturados com butirolactona I apresentaram-se imaturos, parcialmente maturados e maturados. Após a retirada dos oócitos do meio com a butirolactona I, estes se comportaram de forma semelhante aos grupos sem inibidores, sugerindo que a butirolactona I estava influenciando os padrões de distribuição de GC. Em relação aos grupos pré-maturados com roscovitina, a maioria dos oócitos estava maturo,

apresentando o mesmo comportamento do final da pré-maturação com 24 horas. Fica bem claro que a roscovitina não interfere na distribuição dos GC e maturação citoplasmática dos oócitos.

Em oócitos maturados *in vivo* ou *in vitro* os grânulos corticais são encontrados em sua maioria na região do córtex celular (CONNORS et al., 1998; WESSEL et al., 2001; VELILLA et al., 2004), sendo um dos indicativos de maturação citoplasmática. A migração dos grânulos corticais para a região do córtex celular, nos oócitos maturados *in vitro* por 24 horas após o bloqueio da meiose com butirolactona I foi similar aos oócitos submetidos somente à maturação *in vitro*. Esses resultados condizem com os descritos para oócitos maturados *in vitro* (VELILLA et al., 2004), sugerindo que o bloqueio do ciclo meiótico pela butirolactona I nos oócitos bovinos não afeta a migração dos grânulos corticais no pós-bloqueio meiótico. COY et al. (2005a) também observaram migração normal após a MIV de oócitos bloqueados com roscovitina, assim como em nosso estudo.

Os oócitos maturados com SFB tiveram a menor porcentagem de oócitos maduros quando comparados aos demais grupos. Desta maneira, podemos observar que apenas 50% oócitos maturados com SFB têm os GC distribuídos na periferia dos oócitos. Assim, baseado especificamente na redistribuição dos GC, os resultados demonstraram que o bloqueio meiótico, tanto com roscovitina como com butirolactona I, dá uma oportunidade adicional para melhorar a maturação citoplasmática. A adição dos antioxidantes parecem não interferir na maturação citoplasmática, já que os grupos contendo estes antioxidantes se comportaram da mesma maneira que os grupos somente com inibidores. Assim como na maturação nuclear, era esperado que estes antioxidantes não interferissem na cinética da maturação citoplasmática já que atuam no meio de maturação aumentando a síntese de GSH no oócito bovino durante a MIV.

### **Experimento III – Determinação da Concentração Intraoocitária de Glutathiona**

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo fundamental para a proteção celular contra o estresse oxidativo e participa ativamente dos processos de maturação oocitária

(KNAPEN et al., 1999; ABEYDEERA et al., 1998, 1999). Sua função principal é a de proteção da membrana celular. DE MATOS et al. (1996) demonstraram que a adição de cisteamina, cisteína e  $\beta$ -mercaptoetanol ao meio de maturação aumenta a síntese de GSH em oócitos bovinos durante a MIV. Este aumento de GSH abastece os oócitos maturados *in vitro* de grande estoque de GSH disponível para a proteção do embrião até o estágio de blastocisto (DE MATOS et al., 1995, 1996; TELFORD et al., 1990).

Avaliando as concentrações de GSH por oócito observamos que os grupos pré-maturados somente com inibidores e sem antioxidantes (CB e CR), e também os grupos pré-maturados e em seguida cultivados com  $\beta$ -mercaptoetanol (CBM e CRM) foram os grupos com menor produção de GSH intracelular, ou ainda apresentaram maior consumo. Como os grupos CB e CR não foram suplementados com nenhum tipo de antioxidante, a baixa concentração intracelular de GSH era esperada. Entretanto, os grupos CBM e CRM foram pré-maturados e em seguida maturados na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol e apresentaram apenas a concentração de GSH de 2,12 e 2,00 pmol/oócito, respectivamente. O resultado esperado era que houvesse uma concentração de GSH similar ao grupo CM (apenas maturado com  $\beta$ -mercaptoetanol), que teve uma concentração de GSH de 3,02 pmol/oócito e foi semelhante aos demais grupos com antioxidantes e também aos grupos S e C, com 3,66 e 3,20 pmol/oócito respectivamente. AVELINO (2004) obteve maior concentração de GSH (5,51 pmol/oócito) para os oócitos maturados com  $\beta$ -mercaptoetanol, todavia este autor utilizou associação do  $\beta$ -mercaptoetanol com cisteína e utilizou o dobro da dose (100  $\mu$ M) que utilizamos (50  $\mu$ M). O mesmo ocorreu com os oócitos maturados com cisteamina, sendo que nossos resultados foram de 2,91 pmol/oócito (50  $\mu$ M) diferindo de AVELINO (2004) com 5,51 pmol/oócito (100  $\mu$ M), e de WOLF (2005) com 4,25 pmol/oócito (100  $\mu$ M) (ambos com oócitos maturados com cisteamina + cisteína), assim como outros resultados da literatura na espécie bovina (DE MATOS et al., 1996, 2002; VAN SOOM et al., 2002). Dessa forma, parece que os inibidores butirolactona I e roscovitina podem interferir na ação antioxidante do  $\beta$ -mercaptoetanol. Observamos, ainda, que concentrações maiores de cisteamina ou  $\beta$ -mercaptoetanol já foram

avaliadas e podem ser mais eficientes em aumentar as concentrações intracelulares de GSH em oócitos bovinos maturados *in vitro*.

FURNUS e DE MATOS (1999) demonstraram que a biosíntese de GSH no oócito é limitada pela presença de L-cisteína no meio. Além disso, após a preparação do meio, a cisteína sofre auto-oxidação formando cistina, e conseqüentemente a produção de GSH pode ser prejudicada devido à carência deste substrato, e oócitos podem maturar em condições sub-ótimas (DE MATOS e FURNUS, 2000). Estas considerações podem explicar as diferenças observadas nos levando a pensar que a associação com a cisteína se faz necessária para que aumente a produção intracelular de GSH em oócito bovinos.

## **Conclusões**

A butirolactona I é capaz de bloquear a maturação meiótica de maneira reversível e mais eficiente que a roscovitina.

A presença dos antioxidantes cisteamina e  $\beta$ -mercaptoetanol influenciou de maneira negativa o bloqueio da meiose com roscovitina, porém não interferiu na posterior retomada da maturação nuclear.

A butirolactona I interferiu no reposicionamento dos GC atrasando, também, a maturação citoplasmática.

A roscovitina não interferiu na distribuição dos GC e maturação citoplasmática de oócitos bovinos.

A adição dos antioxidantes ao meio de maturação não interferiu na cinética da maturação citoplasmática.

A adição de antioxidantes cisteamina e  $\beta$ -mercaptoetanol no cultivo de maturação não proporcionou aumento da concentração de glutatona nos oócitos, porém a adição de cisteamina durante o cultivo de pré-maturação permitiu que as concentrações de glutatona fossem similares às dos grupos controle.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEYDEERA, L.R.; WANG, W.H.; CANTLEY, T.C.; PRATHER, R.S.; DAY, B.N. Presence of  $\beta$ -mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocyst development after *in vitro* fertilization. **Theriogenology**, v. 50, p. 747-756, 1998.

ABEYDEERA, L.R.; WANG, W.H.; CANTLEY, T.C.; PRATHER, R.S.; DAY, B.N. Glutathione content and embryo development after *in vitro* fertilization of pig oocytes matured in the presence of a thiol compound and various concentration of cysteine. **Zygote**, v. 7, p. 203-210, 1999.

ADONA, P.R.; LEAL, C.L.V. Meiotic inhibition with different cyclin-dependent kinase inhibitors in bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. **Zygote**, v. 12, p. 197-204, 2004

AVELINO, K.B. **Efeitos da estimulação e inibição da síntese de glutatona durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre o desenvolvimento e viabilidade embrionária**. 2004. 93p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias “Júlio de Mesquita Filho”, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

AVERY, B.; HAY-SCHMIDT, A.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Embryo development, oocyte morphology, and kinetics of meiotic maturation in bovine oocytes exposed to 6-dimethylaminopurine prior to *in vitro* maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 50, p. 334-344, 1998.

BARRETTO, L.S.S.; CAIADO CASTRO, V.S.D.; GARCIA, J.M.; MINGOTI, G.Z. Role of roscovitine and IBMX on kinetics of nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 202-207, 2007.

BEKER-VAN WOUDEBERG, A.R.; ZEINSTR, E.C.; ROELEN, B.A.J.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M. Developmental competence of bovine oocytes after specific inhibition of MPH kinase activity: effect of estradiol supplementation and follicle size. **Animal Reproduction Science**, v. 92, p. 231-240, 2006.

BROWNE, R.W.; ARMSTRONG, D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. In: ARMSTRONG, D., (Ed). **Methods in molecular biology: free radical and antioxidants protocols**. New Jersey: Human Press, 1998. v. 108, p. 347-353.

CHERR, G.N.; DROBNIS, E.Z.; KATZ, D.F. Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. **Journal of Experimental Zoology**, v. 246, p. 81-93, 1988.

CONNORS, S.A.; KANATSU-SHINOHARA, M.; SCHULTZ, R.M.; KOPF, G.S. Involvement of the cytoskeleton in the movement of cortical granules during oocyte maturation, and cortical granule anchoring in mouse eggs. **Developmental Biology**, v. 200, p. 103–115, 1998.

COY, P.; ROMAR, R.; PAYTON, R.R.; McCANN, L.; SAXTON, A.M.; EDWARDS, J.L. Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes using the S-enantiomer of roscovitine: effects on maturation, fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. **Reproduction**, v. 129, p. 19-26, 2005a.

COY, P.; ROMAR, R.; RUIZ, S.; CÁNOVAS, S.; GADEA, J.; VÁZQUEZ, F.G.; MATÁS, C. Birth of piglets after transferring of *in vitro*-produced embryos pre-matured with R-roscovitine. **Reproduction**, v. 129, p. 747-755, 2005b.

DAMIENS, E.; MEIJER, L. Inhibiteurs chimiques des kinases cycline-dépendentes: études précliniques et cliniques. **Phatologie Biologie**, v. 48, p. 340-341, 2000.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology**, v. 53, p. 761-771, 2000.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F.; BALDASSARRE, H. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, p. 432-436, 1995.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F.; MARTINEZ, A.G.; MATKOVIC, M. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 451-457, 1996.

DE MATOS, D.G.; HERRERA, C.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; VAN SOOM, A.; NOGUEIRA, D.; PASQUALINI, R.S. Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine *in vitro* embryo production. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, p. 203-209, 2002.

FURNUS, C.C.; DE MATOS, D.G. The availability of cysteine in culture medium appears to be the limiting factor for glutathione synthesis in mammalian oocytes. **Theriogenology**, v. 51, p. 373, 1999.

HE, C.L.; DAMIANI, P.; PARYS, J.B.; FISSORE, R.A. Calcium, calcium release receptors, and meiotic resumption in bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1245-1255, 1997.

HOUSE EAR INSTITUTE. In: House Ear Institute, 2001, Los Angeles – CA. Disponível em <http://www.hei.org/research/depts/aemi/moviol.htm>. Acesso em: 25 de setembro de 2006.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 23-32, 1997.

IMAI, H.; NAGAI, T.; KOBAYASHI, S.; TSUJINO, T.; KOJIMA, T. Effects of butyrolactone I on GVBD in bovine oocytes and their subsequent maturation, fertilization and development *in vitro*. **Theriogenology**, v. 51, pp. 377, 1999 (abstract).

KITAGAWA, M.; OKABE, T.; OGINO, H.; MATSUMOTO, H.; SUZUKI-TAKAHASHI, I.; KOKUBO, T.; HIGASHI, H.; SAITOH, S.; TAYA, Y.; YASUDA, H.; OHBA, Y.; NISHIMURA, S.; TANAKA, N.; OKUYAMA, A. Butyrolactone I, a selective inhibitor of cdk2 and cdc2 kinase. **Oncogene**, v. 8, p. 2425-2432, 1993.

KITAGAWA, M.; HIGASHI, H.; SUZUKI-TAKAHASHI, I.; OKABE, T.; OGINO, H.; TAYA, Y.; NISHIMURA, S.; OKUYAMA, A. A cyclin-dependent kinase inhibitor butyrolactone I, inhibits phosphorylation of RB protein and cell cycle progression. **Oncogene**, v. 9, p. 2549-2557, 1994.

KNAPEN, M.F.C.M.; ZUSTERZEEL, P.L.M.; PETERS, W.H.M.; STEEGERS, A.P. Glutathione and glutathione related enzymes in reproduction: a review. **European Journal of Obstetrics Gynecology Reproductive Biology**, v. 82, p. 171-84, 1999.

KNOCKAERT, M.; GREENGARD, P.; MEIJER, L. Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. **Trends in Pharmacological Science**, v. 23, p. 417-425, 2002.

KRISCHECK, C.; MEINECKE, B. Roscovitine, a specific inhibitor of cyclin-dependent protein kinases, reversibly inhibits chromatin condensation during *in vitro* maturation of porcine oocytes. **Zygote**, v. 9, p. 309-316, 2001.

KUBELKA, M.; MOTLIK, J.; SCHULTZ, R.M.; PAVLOK, A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 292-302, 2000.

KUBELKA, M.; ANGER, M.; KALOUS, J.; SCHULTZ, R.M.; MOTLIK, J. Chromosome condensation in pig oocytes: lack of a requirement for either cdc2 kinase or MAP kinase activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 63, p. 110-118, 2002.

LEQUARRE, A.S.; TRAVERSO, J.M.; MARCHANDISE, J.; DONAAY, I. Poly(A) RNA is reduced by half during bovine oocyte maturation but increases when meiotic arrest is maintained with CDK inhibitors. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 425-431, 2004.



- LONERGAN, P.; DINNYES, A.; FAIR, T.; YANG, X.; BOLAND, M. Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butirolactone I. **Molecular Reproduction and Development**, v. 57, p. 204-209, 2000.
- MARCHAL, R.; TOMANEK, M.; TERQUI, M.; MERMILLOD, P. Effect of cell cycle dependent kinases inhibitor on nuclear and cytoplasmic maturation of porcine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, p. 65-73, 2001.
- MEIJER, L.; BORGNE, A.; MULNER, O.; CHONG, J.P.J.; BLOW, J.J.; INAGAKI, N.; INAGAKI, M.; DELCROS, J.G.; MOULINOUX, J.P. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. **European Journal of Biochemistry**, v. 243, p. 527-536, 1997.
- MERMILLOD, P.; TOMANEK, M.; MARCHAL, R.; MEIJER, L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 89-95, 2000.
- MOTLIK, J.; PAVLOK, A.; KUBELKA, M.; KALOUS, J.; KALAB, P. Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocyte. **Theriogenology**, v. 49, p. 461-469, 1998.
- NASR-ESFAHANI, M.H.; AITKEN, J.R.; JOHNSON, M.H. Hydrogen peroxide levels in mouse oocyte and early cleavage stages embryos developed *in vitro* or *in vivo*. **Development**, v. 109, p. 501-507, 1990.
- PONDERATO, N.; LAGUTINA, I.; CROTTI, G.; TURINI, P.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Bovine oocytes treated prior to *in vitro* maturation with a combination of butyrolactone I and roscovitine at low doses maintain a normal development capacity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, p. 579-585, 2001.
- RICHARD, F.J.; FORTIER, M.A.; SIRARD, M.A. Role of the cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase in the control of meiotic resumption in bovine oocytes cultured with theca cell monolayers. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 1363-1369, 1997.
- RODRIGUEZ, K.F., FARIN, C.E. Developmental capacity of bovine cumulus oocytes complexes after transcriptional inhibition of germinal vesicle breakdown. **Theriogenology**, v. 61, p. 1499-1511, 2004.
- SAEKI, K.; NAGAO, Y.; KISHI, M.; NAGAI, M. Developmental capacity of bovine oocytes following inhibition of meiotic resumption by cycloheximide or 6-dimethylaminopurine. **Theriogenology**, v. 48, p. 1161-1172, 1997.

SIRARD, M.A. Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, p. 1241-1254, 2001.

TELFORD, N.A.; WATSON, A.J.; SCHULTZ, G.A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Molecular Reproduction and Development**, v. 26, p. 90-100, 1990.

VAN SOOM, A.; YUAN, Y.Q.; PEELMAN, L.J.; DE MATOS, D.G.; DEWULF, J.; LAESENS, H.; DE KRUIF, A. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. **Theriogenology**, v. 57, p. 1453-1465, 2002.

VELILLA, E.; IZQUIERDO, D.; RODRIGUEZ-GONZALEZ, E.; LOPEZ-BEJAR, M.; VIDAL, F.; PARAMIO, M.T. Distribution of prepubertal and adult goat oocyte cortical granules during meiotic maturation and fertilisation: ultrastructural and cytochemical study. **Molecular Reproduction and Development**, v. 68, p. 507-514, 2004.

VIGNERON, C.; PERREAU, C.; DALBIÉS-TRAN, R.; JOLY, C.; HUMBLLOT, P.; UZBEKOVA, S.; MERMILLOD, P. Protein synthesis and mRNA storage in cattle oocytes maintained under meiotic block by roscovitine inhibition of MPF activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 69, p. 457-465, 2004.

WESSEL, G.M.; BROOKS, J.M.; GREEN, E.; HALEY, S.; VORONINA, E.; WONG, J.; ZAYDFUDIM, V.; CONNER, S. The Biology of Cortical Granules. Department of Molecular Biology, **Cell Biology & Biochemistry**. Brown University. Providence, Rhode Island, 02912. 2001. E-mail: rhet@brown.edu 90p.

WOLF, A. **Estímulo da síntese de glutatona na maturação in vitro de oócitos bovinos e sua influência no desenvolvimento embrionário**. 2005. 101p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia “Júlio de Mesquita Filho”, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

WU, G.M.; SUN, Q.Y.; MAO, J.; LAI, L.; PARK, K.W.; PRATHER, R.S.; DIDION, B.A.; DAY, B.N. High developmental competence of pig oocytes after meiotic inhibition with a specific M-phase promoting factor kinase inhibitor, butyrolactone I. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 170-177, 2002.

YANG, X.; KUBOTA, C.; SUZUKI, H.; TANEJA, M.; BOLS, P.E.J.; PRESICCE, G.A. Control of oocyte maturation in cows – Biological factors. **Theriogenology**, v. 49, p. 471-482, 1998.

### **CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO E DA QUALIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* APÓS INIBIÇÃO DA MEIOSE COM BUTIROLACTONA I E ROSCOVITINA EM MEIO SUPLEMENTADO COM ANTIOXIDANTES**

**RESUMO** – Muitos fatores influenciam o desenvolvimento e viabilidade do embrião, sendo de particular importância as condições de cultivo do oócito durante o processo de maturação. Neste experimento, oócitos bovinos foram pré-maturados com inibidor de maturação nuclear (butirolactona I ou roscovitina) e maturados *in vitro* com antioxidante (cisteamina ou  $\beta$ -mercaptoetanol). Os oócitos foram subsequentemente fecundados e cultivados *in vitro*. A avaliação do desenvolvimento embrionário foi realizada 40 horas pós-inseminação (hpi) (clivagem), 168 horas (formação de blastocistos) e 192 horas (blastocistos eclodidos e em processo de eclosão). Os grupos de oócitos pré-maturados com roscovitina tiveram a menor taxa de clivagem (73,33 – 75,25%), formação de blastocistos (14,17 – 19,10% com 168 hpi) (22,71 - 25,48% 192 hpi) e eclosão (6,55 – 25,51%) quando comparados aos demais grupos ( $P < 0,05$ ). Os outros grupos variaram a taxa de clivagem entre 85,00 e 90,69%, formação de blastocistos com 168 hpi entre 33,66 e 49,00%, e com 192 hpi entre 41,45 e 58,00% e eclosão entre 24,93 e 38,23%. A qualidade embrionária foi avaliada 168 hpi pela técnica de coloração diferencial por fluorocromo com a contagem do número total de células e número de células da massa celular interna (MCI) e do trofoblasto (TF). Não foi observada diferença ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos em relação ao número total de células da MCI (27,55 – 33,85%) e do TF (66,15 – 72,45%). Os resultados mostraram que o bloqueio da meiose de oócitos com butirolactona I não prejudicou a subsequente fecundação e nem o desenvolvimento embrionário. Todavia, o bloqueio com roscovitina influenciou negativamente estes parâmetros, e a adição dos antioxidantes cisteamina ou  $\beta$ -mercaptoetanol ao meio de maturação não influenciou a produção e a qualidade dos blastocistos.

**Palavras-Chave:** maturação *in vitro*, fecundação *in vitro*, embrião, bovino, antioxidantes, butirolactona I, roscovitina.

## Introdução

Nos sistemas de produção *in vitro* de embriões (PIV) vários parâmetros influenciam o desenvolvimento e a viabilidade embrionária, sendo particularmente importante a condição de cultivo do oócito durante o processo de maturação. O meio de maturação e seus suplementos podem atuar de forma benéfica ou não no desenvolvimento embrionário (BRISON e SCHULTZ, 1997; KRISHER e BAVISTER, 1998).

A maturação compreende todos os eventos que permitem ao oócito expressar seu potencial máximo de desenvolvimento após a fecundação, incluindo a progressão da meiose (maturação nuclear) e alterações morfológicas, bioquímicas e moleculares (maturação citoplasmática). Entretanto, a maturação nuclear do oócito não é suficiente para resultar no subsequente desenvolvimento embrionário. Pode-se hipotetizar que se oócitos são cultivados *in vitro* antes da maturação sob condições que mantém estacionado o estágio de vesícula germinativa (VG), estes podem ter a oportunidade de adquirir uma grande competência no desenvolvimento. Tentativas têm sido feitas com o intuito de manter a meiose estacionada com estabilização farmacológica, e dentre as drogas mais utilizadas para este propósito pode-se citar o cicloheximide, 6-dimetilaminopurina, butirrolactona I e a roscovitina (RICHARD et al., 1997; SAEKI et al., 1997; AVERY et al., 1998; KUBELKA et al., 2000; MERMILLOD et al., 2000). Esta inibição é reversível e pode ser explorada usando-se um duplo sistema de cultura com pré-maturação com inibidores seguida de maturação, com o objetivo de aumentar a competência de desenvolvimento dos oócitos (PONDERATO et al., 2001).

Por outro lado, a pré-maturação implica no prolongamento do tempo em que os oócitos são mantidos em cultivo. Em sistemas de cultivo *in vitro*, o estresse oxidativo ocorre quando o acúmulo de espécies reativas ao oxigênio (ROS) ultrapassa a capacidade antioxidante do sistema. Nesta situação, os embriões são danificados devido a peroxidação de fosfolipídeos de membrana e à alteração de muitos tipos de moléculas celulares, tais como lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos (NASR-ESFAHANI et al., 1990). As ROS ainda induzem a inibição da fusão espermatozóide-

oócito (AITKEN et al., 1993). Assim, a adição de antioxidantes ao meio de cultura tem demonstrado ser efetiva na manutenção do desenvolvimento embrionário *in vitro* (TAKAHASHI et al., 1993; LIM et al., 1996; CAAMAÑO et al., 1996; LIM et al., 1999). DE MATOS et al. (1995; 1996) demonstraram que a suplementação do meio de MIV com cisteamina aumentou o conteúdo intracelular de GSH em oócitos bovinos e melhorou o desenvolvimento e qualidade dos embriões. Proteger embriões contra o estresse oxidativo parece ser uma das chaves em melhorar o desenvolvimento.

Os objetivos deste trabalho foram determinar qual o melhor momento de fecundação e avaliar o desenvolvimento e qualidade de embriões obtidos a partir de oócitos cultivados com inibidores da maturação nuclear e antioxidantes.

## **Material e Métodos**

### **Obtenção e seleção dos oócitos**

Os ovários de bovinos abatidos nos abatedouros de Guararapes-SP e Birigüi-SP foram retirados das carcaças aproximadamente 20 minutos após o abate, mantidos em solução salina estéril a 30-35°C e transportados para o laboratório em caixas térmicas, não excedendo o limite de 6 horas desde o abate até o início das aspirações. As punções foliculares foram realizadas manualmente por meio de agulha de calibre 18-G adaptada a seringa de 20 mL, ambas descartáveis. Todo o material aspirado foi transferido para tubos plásticos de 50 mL e decantado por 15 minutos para seleção dos oócitos.

O sedimento foi transferido para placas de poliestireno de 60 mm de diâmetro e avaliado em microscópio estereoscópico. Os oócitos com *cumulus* compacto, possuindo pelo menos 4 camadas de células e de aparência saudável (citoplasma de granulação homogênea) foram selecionados para o cultivo de maturação.

### **Maturação dos oócitos**

Os oócitos selecionados foram lavados duas vezes em meio de lavagem H-199 (meio TCM-199 suplementado com 0,2 mM de piruvato, 20 mM de HEPES, 5 mM de

bicarbonato de sódio e 75 µg/mL de amicacina) e uma vez em meio de pré-maturação (meio TCM-199, suplementado com 75 µg/mL de amicacina, 0,3% de BSA e 0,2 mM de piruvato). O meio de pré-maturação foi suplementado com 25 µM de roscovitina ou 100 µM de butirolactona I e 50 µM de β-mercaptoetanol ou 50 µM de cisteamina. Somente foram pré-maturados os oócitos dos grupos contendo inibidores da maturação nuclear.

Ao término do cultivo de pré-maturação, os oócitos foram transferidos para placa de cultura contendo meio de maturação B-199 (meio TCM-199 suplementado com 0,2 mM de piruvato, 25 mM de bicarbonato de sódio, 75 µg/mL de amicacina, 1 µg/mL de 17-β estradiol, 0,5 µg/mL de FSH, 100 UI/mL de hCG e 0,6% de BSA) suplementado ou não com 50 µM de β-mercaptoetanol e/ou 50 µM de cisteamina. Os demais grupos experimentais (sem inibidores da maturação nuclear) foram apenas cultivados em meio de maturação B-199.

Os oócitos de todos os grupos foram cultivados em microgotas de 100 µL de meio recoberto com óleo mineral, em estufa a 38,8°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar e máxima umidade.

### **Fecundação *in vitro***

Após o cultivo de maturação (24 horas para os grupos sem inibidores de maturação nuclear, e 20 horas para os grupos com inibidores), os COCs foram submetidos à fecundação *in vitro*. Foi utilizado sêmen de um único doador e lote da raça Limousin. A palheta foi descongelada em banho-maria a 35-37°C durante 30 segundos e lavada por três vezes em 2 mL de meio TL-Sêmen cada vez, adicionado de antibiótico e 2 µL/mL do estoque C, por centrifugação a 750 rpm (270xg), durante 5 minutos. Na última lavagem, 30 µL do sedimento foi recuperado e depositado em um microtubo com 30 µL de meio TALP-FIV, sendo feita avaliação de suas características (motilidade e concentração espermática). A concentração foi ajustada para 25x10<sup>6</sup> espermatozoides vivos por mL, sendo adicionados 4 µL desta diluição para cada gota de fecundação (concentração final de 100 x 10<sup>3</sup> espermatozoides por gota de meio). Após a maturação, os oócitos de cada grupo foram lavados no meio de fecundação

(TALP-FIV) suplementado com 10 µg/mL de heparina, 160 µL PHE e 0,6% BSA, sendo então transferidos para as microgotas de fecundação (20 oócitos/microgota). A fecundação foi realizada a 38,8°C, por 24 horas em estufa contendo 5% CO<sub>2</sub> em ar atmosférico e 99% de umidade.

### **Cultivo de desenvolvimento**

Os zigotos foram lavados duas vezes em meio TALP e uma vez no meio mSOF, sendo então transferidos para as microgotas do cultivo de desenvolvimento *in vitro* (CIV). O cultivo de desenvolvimento embrionário foi realizado em microgotas de 100 µL de meio mSOF suplementado com 0,5% de BSA e 2,5% SFB. O cultivo foi conduzido em estufa à temperatura de 38,8°C, contendo 5% de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico e 99% de umidade, durante 7 dias. A cada 48 horas, 50% do meio de cultivo foram renovados. A avaliação do desenvolvimento embrionário foi realizada às 40 horas (clivagem), 168 horas (formação de blastocistos) e 192 horas (blastocistos eclodidos e em processo de eclosão) pós-inseminação (hpi).

### **Determinação da massa celular interna (MCI) e trofoblasto (TF)**

A qualidade morfológica dos blastocistos foi avaliada pela proporção do número de células da MCI e do TF em relação ao número total (T) de células. O número de células da MCI e do TF foi determinado pela coloração diferencial por fluorocromo, descrita por IWASAKI et al. (1990). A zona pelúcida dos blastocistos foi removida em solução ácida (pH 2,5) por 5 a 10 segundos e, em seguida, estes foram lavados três vezes em meio TCM-199 Hepes com 10% de SFB e duas vezes em meio TCM-199 Hepes sem SFB. Posteriormente, os blastocistos foram fixados em solução de PBS com ácido pícrico (10mM) e polivinil-pirrolidona (PVP) (3mg/mL) sobre gelo, durante 10 minutos. A seguir, foram lavados em meio TCM-199 Hepes, incubados a 38,5°C por 30 minutos em soro de coelho anti-bovino na proporção de 1:10 em meio TCM-199 Bicarbonato. Após nova lavagem em meio TCM-199 Hepes com 10% de SFB, os embriões foram incubados a 38,5°C por 30 minutos em complemento de cobaia na proporção de 1:10 em meio TCM-199 Hepes acrescido de iodeto de propídio (10µg/mL)

e de Hoechst 33342 (10µg/mL). Por fim, foram lavados em PBS com 0,3% de BSA e colocados entre lâmina e lamínula com glicerina tamponada (9:1). Os blastocistos foram avaliados em microscópio de epifluorescência (excitação de 330-385nm e emissão de 420nm) quanto ao número de células da MCI (núcleos com fluorescência azul, determinada pelo Hoechst 33342 – corante vital) e do TF (núcleos com fluorescência rosa, determinada pelo iodeto de propídio – corante não vital).

### **Delineamento experimental**

Os oócitos foram pré-maturados em meio suplementado com 0,3% de BSA e 25 µM de roscovitina ou 100 µM de butirolactona I, e 50 µM de β-mercaptoetanol ou 50 µM de cisteamina. Depois foram maturados em meio B-199 suplementado com 0,6% de BSA e 50 µM de β-mercaptoetanol ou 50 µM de cisteamina conforme grupos experimentais abaixo:

#### **Pré-Maturação:**

TCM-199 suplementado com 0,3% de BSA + 25 µM de roscovitina (**R**);

TCM-199 suplementado com 0,3% de BSA + 25 µM de roscovitina + 50 µM de cisteamina (**RC**);

TCM-199 suplementado com 0,3% de BSA + 25 µM de roscovitina + 50 µM de β-mercaptoetanol (**RM**);

TCM-199 suplementado com 0,3% de BSA + 100 µM de butirolactona I (**B**);

TCM-199 suplementado com 0,3% de BSA + 100 µM de butirolactona I + 50 µM de cisteamina (**BC**);

TCM-199 suplementado com 0,3% de BSA + 100 µM de butirolactona I + 50 µM de β-mercaptoetanol (**BM**);



**Maturação:**

- |                |   |   |
|----------------|---|---|
| SEM<br>PRÉ-MIV | { | <p><b>(S)</b> → B-199 suplementado com 10% de SFB (PADRÃO);</p> <p><b>(C)</b> → B-199 suplementado com 0,6% de BSA (CONTROLE);</p> <p><b>(CC)</b> → B-199 suplementado com 0,6% de BSA + 50 µM de cisteamina;</p> <p><b>(CM)</b> → B-199 suplementado com 0,6% de BSA + 50 µM de β-mercaptoetanol;</p>  |
| COM<br>PRÉ-MIV | { | <p><b>(CR)</b> → B-199 suplementado com 0,6% de BSA</p> <p><b>(CRC)</b> → B-199 suplementado com 0,6% de BSA + 50 µM de cisteamina</p> <p><b>(CRM)</b> → B-199 suplementado com 0,6% de BSA + 50 µM de β-mercaptoetanol</p> <p><b>(CB)</b> → B-199 suplementado com 0,6% de BSA</p> <p><b>(CBC)</b> → B-199 suplementado com 0,6% de BSA + 50 µM de cisteamina</p> <p><b>(CBM)</b> → B-199 suplementado com 0,6% de BSA + 50 µM de β-mercaptoetanol</p> |

**Experimento I: Momento de fecundação**

Este experimento foi realizado para determinar qual o melhor momento de fecundação de oócitos maturados *in vitro*, em meio suplementado com roscovitina ou butirolactona I. Desta forma os oócitos foram pré-maturados por 24 horas em meio suplementado com 0,3% de BSA e 25 µM de Roscovitina (**R**) ou 100 µM de Butirolactona I (**B**) e em seguida maturados por 16, 20 ou 24 horas em meio B-199 suplementado com 0,6% de BSA conforme grupos experimentais (**CR**) e (**CB**). Os grupos experimentais (**S**) e (**C**) foram apenas cultivados em meio de maturação B-199 por 24 horas. Depois foram submetidos à fecundação por 24 horas e avaliadas a capacidade de clivagem e a competência em desenvolvimento até a fase de blastocisto.

**Experimento II: Avaliação do desenvolvimento embrionário**

Neste experimento, os oócitos depois de maturados (24 horas para os grupos sem inibidores de maturação nuclear, e 20 horas para os grupos com inibidores) foram

submetidos à fecundação por 24 horas. Foram avaliadas a capacidade de clivagem e a competência em desenvolvimento até a fase de blastocisto.

### **Experimento III: Avaliação da qualidade embrionária**

Neste experimento, foi avaliada a qualidade embrionária pela coloração diferencial dos embriões (trofoblasto e massa celular interna).

### **Análise Estatística**

Para avaliar-se o efeito da suplementação do meio de cultura com inibidores da maturação nuclear e antioxidantes sobre o momento de fecundação (experimento I), e sobre a fecundação e desenvolvimento do embrião (experimento II), os dados foram analisados pela fração de oócitos cultivados que atingiram os estágios determinados de desenvolvimento, reportados em termos de porcentagem (%). Como a porcentagem de oócitos clivados e blastocistos não obteve distribuição normal, os dados foram transformados em  $\text{arc sen } \sqrt{\%}$ . Foi aplicada análise de variância (ANOVA) para comparação dos tratamentos, em cada uma das fases de desenvolvimento do embrião e posteriormente foi aplicado teste de Tukey para comparação múltipla das médias. Para as variáveis porcentagens de MCI e de TF em relação ao número total de células do embrião (experimento III) foi realizada a análise de variância (ANOVA) e posteriormente foi aplicado teste de Tukey para comparação múltipla das médias. Para comparação entre as médias e as frequências de blastocistos reclassificados como superiores ou excelentes foi utilizado o teste exato de Fisher.

O nível de significância adotado foi de 5%. A análise estatística foi efetuada empregando-se o sistema SAS (Statistical Analysis System).

## **Resultados**

### **Experimento I: Momento de fecundação**

Os oócitos pré-maturados com roscovitina ou butirolactona I e maturados por 16 ou 20 horas tiveram uma produção de embriões semelhante entre si e entre os grupos

padrão do laboratório (10% SFB) e controle (0,6% BSA) com 168 (16,67 a 41,00%) e 192 horas (23,41 a 46,63%) de cultivo. Entretanto, com 24 horas de cultivo de maturação, os grupos dos oócitos pré-maturados com roscovitina ou butirolactona I tiveram a menor taxa de formação de blastocistos (8,89 e 10,00%, respectivamente) ao final das 168 horas quando comparados aos demais grupos (Tabela 1). Como não houve diferença entre os grupos nos horários de 16 e 20 horas de maturação, optou-se em realizar a FIV com 20 horas de maturação para os grupos pré-maturados com inibidores de maturação nuclear, e 24 horas de maturação para os grupos maturados sem inibidores de maturação nuclear.

**Tabela 1** - Desenvolvimento embrionário de oócitos pré-maturados durante 24 horas com inibidores da maturação nuclear (butirolactona I ou roscovitina) seguidos do cultivo de maturação por 16, 20 ou 24 horas.

Grupos	Horário Fiv (h)	Nº de oócitos	Clivagem	BI (168 h)		BI (192 h)
				n (Média (%) ± EPM)		
S	24	88	79 (89,73 ± 5,29) <sup>a</sup>	36 (41,00 ± 4,32) <sup>a</sup>	40 (45,59 ± 6,13) <sup>a</sup>	
C	24	88	85 (96,59 ± 0,04) <sup>a</sup>	35 (39,81 ± 1,57) <sup>a</sup>	41 (46,63 ± 2,58) <sup>a</sup>	
CB	16	90	72 (80,00 ± 5,09) <sup>a</sup>	16 (17,78 ± 9,09) <sup>ab</sup>	25 (27,78 ± 13,65) <sup>a</sup>	
CR	16	89	77 (86,59 ± 5,04) <sup>a</sup>	28 (31,57 ± 5,27) <sup>ab</sup>	35 (39,35 ± 6,81) <sup>a</sup>	
CB	20	90	76 (84,44 ± 6,19) <sup>a</sup>	15 (16,67 ± 3,33) <sup>ab</sup>	29 (32,22 ± 5,88) <sup>a</sup>	
CR	20	89	72 (80,80 ± 5,09) <sup>a</sup>	15 (16,70 ± 7,66) <sup>ab</sup>	21 (23,41 ± 9,56) <sup>a</sup>	
CB	24	90	83 (92,22 ± 2,94) <sup>a</sup>	9 (10,00 ± 3,85) <sup>b</sup>	21 (23,33 ± 6,67) <sup>a</sup>	
CR	24	90	67 (74,44 ± 4,84) <sup>a</sup>	8 (8,89 ± 7,29) <sup>b</sup>	8 (8,89 ± 7,29) <sup>a</sup>	

<sup>ab</sup> Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de ANOVA (P<0,05).

### Experimento II: Avaliação do desenvolvimento embrionário

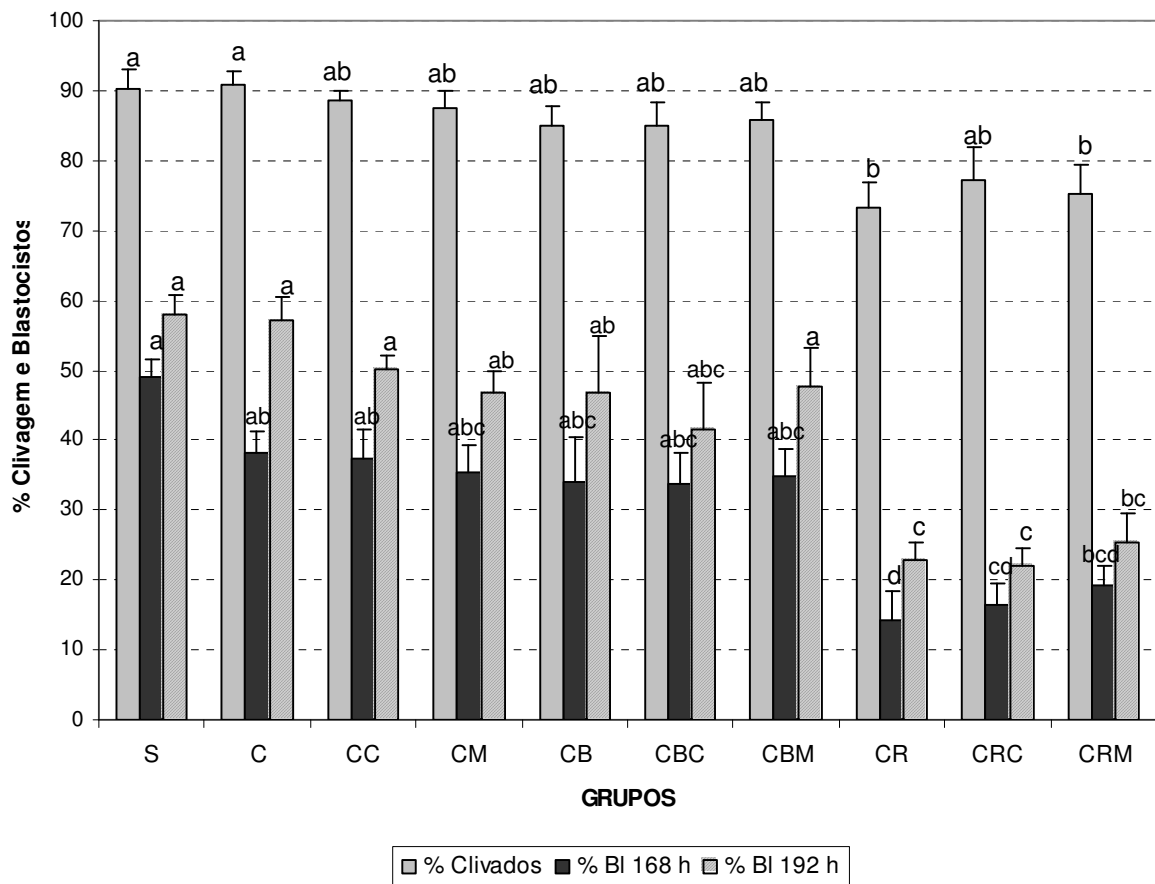
Os grupos de oócitos pré-maturados com roscovitina tiveram a menor taxa de clivagem (73,33 – 75,25%), formação de blastocistos (14,17 – 19,10% com 168 hpi) (22,71 - 25,48% 192 hpi) e eclosão (6,55 – 25,51%) quando comparados aos demais grupos (P<0,05). O grupo dos oócitos maturados com SFB teve a maior produção de blastocistos com 168 hpi (49,00%) quando comparado aos grupos pré-maturados com roscovitina (P<0,05), mas não diferiu dos demais grupos. A taxa de formação de blastocistos com 192 hpi nos grupos sem inibidores de maturação nuclear e naqueles pré-maturados com butirolactona I foi de 41,45 – 58,00% e a eclosão ficou entre 24,93

– 38,23%, diferindo apenas dos grupos pré-maturados com roscovitina ( $P < 0,05$ ). Os resultados estão demonstrados na tabela 2 e figura 1:

**Tabela 2** – Desenvolvimento embrionário de oócitos pré-maturados durante 24 horas com inibidores da maturação nuclear (butirolactona I ou roscovitina) e antioxidantes (cisteamina ou  $\beta$ -mercaptoetanol) seguidos do cultivo de maturação por 20 horas.

Grupos	Nº de Oócitos	Clivagem	Blastocistos n (Média (%) $\pm$ EPM)		
			BI (168 h)	BI (192 h)	Eclosão (192 h)
S	175	158 (90,22 $\pm$ 2,94) <sup>a</sup>	86 (49,00 $\pm$ 2,49) <sup>a</sup>	102 (58,00 $\pm$ 2,64) <sup>a</sup>	39 (38,23 $\pm$ 5,96) <sup>a</sup>
C	164	149 (90,69 $\pm$ 1,94) <sup>a</sup>	61 (38,22 $\pm$ 3,08) <sup>ab</sup>	93 (57,08 $\pm$ 3,37) <sup>a</sup>	23 (26,18 $\pm$ 5,46) <sup>ab</sup>
CC	174	154 (88,59 $\pm$ 1,30) <sup>ab</sup>	65 (37,45 $\pm$ 3,92) <sup>ab</sup>	87 (50,18 $\pm$ 1,87) <sup>a</sup>	22 (24,93 $\pm$ 6,35) <sup>ab</sup>
CM	160	139 (87,56 $\pm$ 2,44) <sup>ab</sup>	57 (35,33 $\pm$ 3,85) <sup>abc</sup>	74 (46,67 $\pm$ 3,33) <sup>ab</sup>	20 (25,87 $\pm$ 4,84) <sup>ab</sup>
CB	173	147 (85,00 $\pm$ 2,66) <sup>ab</sup>	59 (34,10 $\pm$ 6,46) <sup>abc</sup>	81 (46,68 $\pm$ 8,27) <sup>ab</sup>	27 (26,57 $\pm$ 9,22) <sup>ab</sup>
CBC	174	148 (85,05 $\pm$ 3,39) <sup>ab</sup>	59 (33,66 $\pm$ 4,54) <sup>abc</sup>	73 (41,45 $\pm$ 6,75) <sup>abc</sup>	27 (31,85 $\pm$ 9,48) <sup>ab</sup>
CBM	175	150 (85,89 $\pm$ 2,38) <sup>ab</sup>	61 (34,89 $\pm$ 3,91) <sup>abc</sup>	83 (47,56 $\pm$ 5,78) <sup>a</sup>	31 (33,83 $\pm$ 3,06) <sup>ab</sup>
CR	177	130 (73,33 $\pm$ 3,54) <sup>b</sup>	25 (14,17 $\pm$ 4,19) <sup>d</sup>	40 (22,71 $\pm$ 2,50) <sup>c</sup>	3 (6,55 $\pm$ 4,37) <sup>c</sup>
CRC	172	132 (77,09 $\pm$ 4,87) <sup>ab</sup>	28 (16,41 $\pm$ 3,17) <sup>cd</sup>	38 (22,1 $\pm$ 2,43) <sup>c</sup>	3 (7,50 $\pm$ 3,54) <sup>c</sup>
CRM	172	129 (75,25 $\pm$ 4,12) <sup>b</sup>	33 (19,10 $\pm$ 3,04) <sup>bcd</sup>	44 (25,48 $\pm$ 4,13) <sup>bc</sup>	11 (25,51 $\pm$ 8,45) <sup>bc</sup>

<sup>abcd</sup> Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de ANOVA ( $P < 0,05$ ).



**Figura 1** – Desenvolvimento embrionário de oócitos pré-maturados durante 24 horas com inibidores da maturação nuclear (butirolactona I ou roscovitina) e antioxidantes (cisteamina ou  $\beta$ -mercaptoetanol) seguidos do cultivo de maturação por 20 horas.

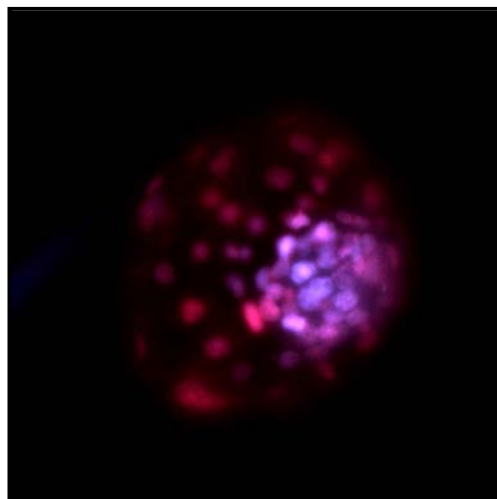
**S**= SFB (10%), **C**= BSA (0,6%), **CC**= BSA (0,6%) + CIS (50  $\mu$ M), **CM**= BSA (0,6%) +  $\beta$ ME (50  $\mu$ M), **CB**= pré-MIV BSA (0,3%) + B (100  $\mu$ M) / MIV BSA (0,6%); **CBC**= pré-MIV BSA (0,3%) + B (100  $\mu$ M) + CIS (50  $\mu$ M) / MIV BSA (0,6%) + CIS (50  $\mu$ M), **CBM**= pré-MIV BSA (0,3%) + B (100  $\mu$ M) +  $\beta$ ME (50  $\mu$ M) / MIV BSA (0,6%) +  $\beta$ ME (50  $\mu$ M), **CR**= pré-MIV BSA (0,3%) + R (25  $\mu$ M) / MIV BSA (0,6%); **CRC**= pré-MIV BSA (0,3%) + R (25  $\mu$ M) + CIS (50  $\mu$ M) / MIV BSA (0,6%) + CIS (50  $\mu$ M), **CRM**= pré-MIV BSA (0,3%) + R (25  $\mu$ M) +  $\beta$ ME (50  $\mu$ M) / MIV BSA (0,6%) +  $\beta$ ME (50  $\mu$ M).

<sup>abcd</sup> Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de ANOVA ( $P < 0,05$ ).

### Experimento III: Avaliação da qualidade embrionária

A qualidade dos blastocistos produzidos após 168 horas de cultivo *in vitro*, verificada pela técnica de coloração diferencial (Figura 2), foi semelhante ( $P > 0,05$ ) entre

os tratamentos. A porcentagem de células da MCI variou entre 27,55 – 33,85% e do TF entre 66,15 – 72,45% (Tabela 3 e Figura 3).



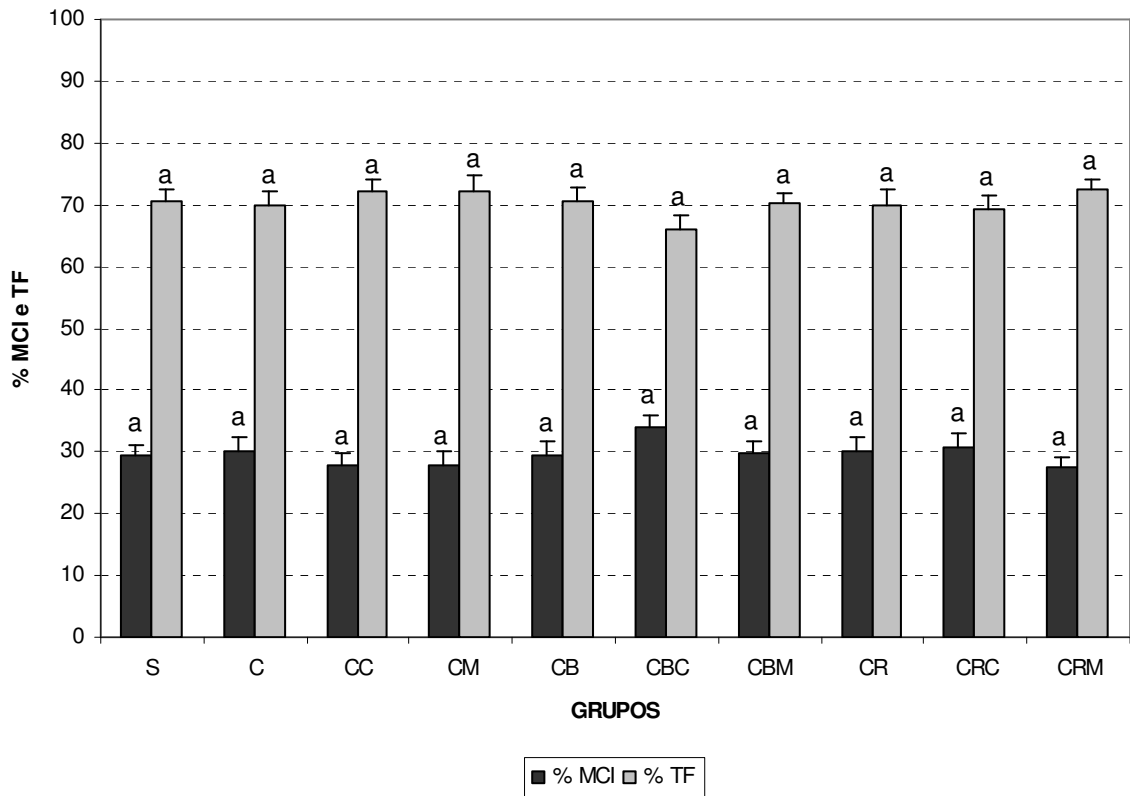
**Figura 2** – Blastocisto corado pela técnica de coloração diferencial, 168 horas após FIV, observados em microscópio de epifluorescência.

Azul: núcleo de células da massa celular interna (MCI), Hoechst 33342; Rosa: núcleo de células do trofoblasto (TF), iodeto de propídeo.

**Tabela 3** – Porcentagem média de células da MCI e TF, em relação ao número total de células dos blastocistos corados por meio de coloração diferencial por fluorocromo após 168 horas de fecundação dos oócitos maturados em diferentes meios.

Grupos	MCI	TF	Células Totais
	Média (%) ± EPM		Média (n) ± EPM
S	29,33 ± 1,82 <sup>a</sup>	70,67 ± 1,82 <sup>a</sup>	50 ± 2,77 <sup>a</sup>
C	30,18 ± 2,29 <sup>a</sup>	69,82 ± 2,29 <sup>a</sup>	48 ± 2,90 <sup>a</sup>
CC	27,74 ± 1,98 <sup>a</sup>	72,26 ± 1,98 <sup>a</sup>	51 ± 2,80 <sup>a</sup>
CM	27,76 ± 2,45 <sup>a</sup>	72,24 ± 2,45 <sup>a</sup>	51 ± 3,54 <sup>a</sup>
CB	29,50 ± 2,19 <sup>a</sup>	70,50 ± 2,19 <sup>a</sup>	46 ± 2,66 <sup>a</sup>
CBC	33,85 ± 2,10 <sup>a</sup>	66,15 ± 2,10 <sup>a</sup>	47 ± 2,50 <sup>a</sup>
CBM	29,79 ± 1,78 <sup>a</sup>	70,21 ± 1,78 <sup>a</sup>	47 ± 1,60 <sup>a</sup>
CR	30,01 ± 2,49 <sup>a</sup>	69,99 ± 2,49 <sup>a</sup>	44 ± 2,37 <sup>a</sup>
CRC	30,74 ± 2,27 <sup>a</sup>	69,26 ± 2,27 <sup>a</sup>	45 ± 2,98 <sup>a</sup>
CRM	27,55 ± 1,64 <sup>a</sup>	72,45 ± 1,64 <sup>a</sup>	49 ± 4,00 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de ANOVA (P>0,05).



**Figura 3** – Percentagem de células da MCI e TF dos blastocistos desenvolvidos por 168 horas proveniente de oócitos maturados *in vitro* em diferentes meios de cultura.

**S**= SFB (10%), **C**= BSA (0,6%), **CC**= BSA (0,6%) + CIS (50  $\mu$ M), **CM**= BSA (0,6%) +  $\beta$ ME (50  $\mu$ M), **CB**= pré-MIV BSA (0,3%) + B (100  $\mu$ M) / MIV BSA (0,6%); **CBC**= pré-MIV BSA (0,3%) + B (100  $\mu$ M) + CIS (50  $\mu$ M) / MIV BSA (0,6%) + CIS (50  $\mu$ M), **CBM**= pré-MIV BSA (0,3%) + B (100  $\mu$ M) +  $\beta$ ME (50  $\mu$ M) / MIV BSA (0,6%) +  $\beta$ ME (50  $\mu$ M), **CR**= pré-MIV BSA (0,3%) + R (25  $\mu$ M) / MIV BSA (0,6%); **CRC**= pré-MIV BSA (0,3%) + R (25  $\mu$ M) + CIS (50  $\mu$ M) / MIV BSA (0,6%) + CIS (50  $\mu$ M), **CRM**= pré-MIV BSA (0,3%) + R (25  $\mu$ M) +  $\beta$ ME (50  $\mu$ M) / MIV BSA (0,6%) +  $\beta$ ME (50  $\mu$ M).

<sup>a</sup> Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de ANOVA ( $P > 0,05$ ).

## Discussão

### Experimento I: Momento de fecundação

Neste estudo foi verificado que a produção de embriões a partir de oócitos pré-maturados com roscovitina ou butirolactona I e maturados por 16 ou 20 horas foi semelhante entre si e entre os grupos controle com SFB e BSA, tanto as 168 quanto às

192 horas de cultivo. Observamos que oócitos pré-maturados com inibidores e posteriormente maturados por um período de 20 horas resultaram, ao final de 192 horas de cultivo, 23,41% de blastocistos (roscovitina) e 32,22% (butirolactona I). ADONA e LEAL (2004) que obtiveram resultados semelhantes aos nossos, 24,2% de blastocistos (roscovitina) e 32,3% (butirolactona I) com 18 horas de maturação.

Ao final das 24 horas de cultivo de maturação, os grupos dos oócitos pré-maturados com roscovitina ou butirolactona I tiveram a menor taxa de formação de blastocistos (8,89 e 10,00%, respectivamente) avaliados às 168 horas, quando comparados aos demais grupos. Estes dados sugerem que o momento da fecundação *in vitro* de oócitos pré-maturados com inibidores de maturação nuclear pode interferir na qualidade do desenvolvimento embrionário. LAGUTINA et al. (2002) observou que 82,5% dos oócitos tratados com roscovitina alcançaram a maturação depois de 16 horas de MIV. As mesmas observações foram feitas por HASHIMOTO et al. (2002) usando butirolactona I (mais de 85% dos oócitos em M II com 18 horas de MIV), assim como ADONA e LEAL (2004) que obtiveram mais de 90% de oócitos bloqueados com butirolactona I ou roscovitina em M II após 18 horas de MIV. Provavelmente este fato ocorre devido à retomada da meiose destes oócitos estar acelerada após a retirada do inibidor, e indica que estes oócitos já estão aptos a serem fecundados com 16 ou 18 horas de MIV. Outra possibilidade é a utilização de inibidores que não assegurem um bloqueio meiótico tão efetivo, permitindo com que parte dos oócitos atinjam o estágio de M II ao final do cultivo de inibição. A maturação nuclear destes oócitos ocorreria por um longo período de tempo, somando-se o período de cultivo da inibição e de cultura de maturação (mais de 42 horas). Uma proporção desses oócitos cultivados *in vitro* teria ficado envelhecida, antes da FIV e CIV. KIM et al. (1996) sugeriram que oócitos que envelhecem *in vitro* têm o subsequente desenvolvimento embrionário diminuído, principalmente por comprometer elementos do citoesqueleto.

### **Experimento II: Avaliação do desenvolvimento embrionário**

Nos sistemas de produção *in vitro* de embriões (PIV) vários parâmetros influenciam o desenvolvimento e a viabilidade embrionária, sendo particularmente



importante a condição de cultivo do oócito durante o processo de maturação. O meio de maturação e seus suplementos podem atuar de forma benéfica ou não no desenvolvimento embrionário (BRISON e SCHULTZ, 1997; KRISHER e BAVISTER, 1998). Recentemente RIZOS et al. (2002) demonstraram que o principal fator que afeta as taxas de blastocistos é a qualidade do oócito, enquanto que as condições do sistema de cultivo *in vitro* influenciam a qualidade de desenvolvimento dos blastocistos. Esta qualidade dos oócitos pode ser relacionada ao período de capacitação observada *in vivo*. Acredita-se que a competência de desenvolvimento pode ser melhorada se oócitos forem mantidos em bloqueio meiótico por um período (cultura de pré-maturação) antes de retomar a meiose, tentando mimetizar a capacitação (HYTTEL et al., 1997; LONERGAN et al., 2000).

Nossos resultados demonstraram que os grupos de oócitos pré-maturados com roscovitina tiveram a menor taxa de clivagem (73,33 – 75,25%) quando comparados aos demais grupos, assim como a menor produção de blastocistos com 168 hpi (14,17 – 19,10%). Já a taxa de formação de blastocistos com 192 hpi após a inibição meiótica com roscovitina foi de 22,71%, similar aos achados de ADONA e LEAL (2004) com 24%, MERMILLOD et al. (2000) com 31% e LAGUTINA et al. (2002) com 25%. A taxa de desenvolvimento embrionário 192 hpi após a inibição meiótica com butirolactona I foi de 46,68%, semelhante aos grupos controle SFB e BSA e melhores do que as obtidas por ADONA e LEAL (2004) com 32% e LONERGAN et al. (2000) com 27%. Essas diferenças entre os laboratórios pode ser o resultado de variações nas condições de cultivo.

A melhor performance da butirolactona I pode ser atribuída a sua melhor e mais uniforme inibição meiótica (85,85%) do que a roscovitina (66,41%), o que pode ter implicações posteriores durante o desenvolvimento embrionário. Considerando que no tratamento com roscovitina houve uma proporção de oócitos que escaparam do bloqueio meiótico (18,57% em MII no final da cultura de inibição), e então iniciaram a progressão meiótica, seria esperado que alguns desses oócitos estariam em maturação nuclear por um longo período de tempo, somando a inibição e o período de cultura de maturação (mais de 42 horas), sendo que parte desses oócitos *in vitro* estaria

envelhecida, antes mesmo da fecundação e do cultivo, podendo diminuir o desenvolvimento embrionário. Por outro lado, no tratamento com butirrolactona I poucos oócitos escaparam do bloqueio (7,07%) e sofreram o processo de envelhecimento, resultando em melhor desenvolvimento (os dados referentes à inibição da maturação nuclear estão dispostos no capítulo 2).

Parece provável que embriões cultivados *in vitro* que são expostos ao estresse oxidativo têm seu mecanismo de defesa insuficiente para proteger sua delicada estrutura celular (ALI et al., 2003). Para proteger os oócitos e os embriões do estresse oxidativo, muitos antioxidantes podem ser adicionados ao meio de cultivo. DE MATOS et al. (1996) demonstraram que a adição de cisteamina, cisteína e  $\beta$ -mercaptoetanol ao meio de maturação aumentou a síntese de glutatona (GSH) intracelular e o desenvolvimento de blastocisto.

Nossos resultados demonstraram que a adição dos antioxidantes cisteamina ou  $\beta$ -mercaptoetanol ao meio de maturação não influenciaram na produção de blastocistos em relação aos grupos controle SFB e BSA com 168 e 192 hpi. DE MATOS e FURNUS (2000) e AVELINO (2004) relataram um aumento da produção de blastocisto 168 hpi provenientes de oócitos maturados com 100  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol em relação ao grupo controle (maturação com SFB). Essas diferenças entre os laboratórios podem ser o resultado de variações nas condições de cultivo, pois foi previamente demonstrado que a associação de  $\beta$ -mercaptoetanol com cisteína, numa concentração de 100  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol podem proporcionar melhores resultados do que os observados em nosso estudo (AVELINO, 2004).

A produção de blastocistos 168 hpi provenientes de oócitos maturados com cisteamina foi semelhante às dos grupos controle assim como para AVELINO (2004) e WOLF (2005), apesar destes autores terem utilizado a associação de cisteamina com cisteína, e o dobro da concentração de cisteamina na maturação que em nosso experimento.

Em estudos anteriores, aumento do percentual de desenvolvimento embrionário foi ressaltado após maturação dos oócitos na presença unicamente de substratos ou precursores de GSH em diversas espécies, entre elas a bovina (DE MATOS et al.,

1996; DE MATOS e FURNUS, 2000). Entretanto, em alguns estudos o uso individual de cisteamina ou  $\beta$ -mercaptoetanol não favoreceu o desenvolvimento individual de blastocistos da espécie bovina. GUYADER-JOLI et al. (1998) demonstraram que sua produção de embriões não melhorou após a adição de 50, 100 ou 250  $\mu$ M de cisteamina no meio de maturação. BLONDIN et al. (1997) também não observaram aumento no percentual de blastocistos após maturação de oócitos em meio suplementado com 10, 100 ou 500  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol.

Outro fator que se evidenciou em nossos resultados foi a baixa taxa de clivagem, produção de embriões com 168 e 192 hpi e eclosão dos grupos dos oócitos pré-maturados com roscovitina. Parece que neste caso os antioxidantes não tiveram influência alguma nos resultados, e que a pré-maturação com roscovitina pode ter interferido no desenvolvimento embrionário.

### **Experimento III: Avaliação da qualidade embrionária**

O número de células é um dos parâmetros mais utilizados para caracterizar a qualidade de embriões produzidos *in vitro*. Durante o processo de desenvolvimento de embriões pré-implantação as células embrionárias se diferenciam em TF ou MCI. As células do TF estão localizadas externamente nos blastocistos e originam as membranas extra-embrionárias, enquanto que as células da MCI originam o feto e contribuem para a formação das membranas extra-embrionárias (NEUBER et al., 2002). O desenvolvimento fetal normal é dependente do número de células do embrião (LANE e GARDNER, 1997) e o estabelecimento de uma proporção entre MCI:TF é considerada essencial para assegurar a viabilidade embrionária (FLEMING, 1987). Embora não se tenha um padrão ideal para esta razão, tem se adotado os valores de uma célula da MCI para duas de TF (AVELINO, 2004).

Neste experimento foram avaliadas as médias do número de células da MCI e do TF. De forma geral, a qualidade dos blastocistos produzidos após 168 horas de cultivo *in vitro*, verificada pela técnica de coloração diferencial, foi semelhante entre os tratamentos. A adição dos antioxidantes cisteamina ou  $\beta$ -mercaptoetanol não aumentou o percentual de células na MCI, no TF e nem no tamanho do blastocisto (número total

de células). Da mesma maneira, WOLF (2005) não observou diferença no tratamento com cisteína associada à cisteamina, nem AVELINO (2004) no tratamento de cisteína associada ao  $\beta$ -mercaptoetanol. Entretanto, este último autor verificou um aumento no percentual de células da MCI no tratamento suplementado com cisteína associada à cisteamina em relação ao controle. A utilização de oócitos tratados com inibidores de maturação nuclear não influenciou no percentual de células na MCI, no TF e número total de células dos embriões cultivados.

## **Conclusões**

Oócitos pré-maturados com roscovitina ou butirolactona I têm menor taxa de formação de blastocistos se maturados por longos períodos (24 horas).

O bloqueio da meiose de oócitos com butirolactona I não prejudicou a subsequente fecundação e nem o desenvolvimento embrionário. Todavia, o bloqueio com roscovitina influenciou negativamente estes parâmetros.

A adição dos antioxidantes cisteamina ou  $\beta$ -mercaptoetanol ao meio de maturação não influenciou na produção de blastocistos.

A adição dos antioxidantes cisteamina ou  $\beta$ -mercaptoetanol e dos inibidores de maturação nuclear roscovitina ou butirolactona I não influenciou na qualidade dos embriões avaliada pela coloração diferencial.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADONA, P.R.; LEAL, C.L.V. Meiotic inhibition with different cyclin-dependent kinase inhibitors in bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. **Zygote**, v. 12, p. 197-204, 2004.

AITKEN, R.J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 257-265, 1993.

ALI, A.A.; BILODEAU, J.F.; SIRARD, M.A. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, v. 59, p. 939-949, 2003.

AVELINO, K.B. **Efeitos da estimulação e inibição da síntese de glutathiona durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre o desenvolvimento e viabilidade embrionária.** 2004. 93p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias “Júlio de Mesquita Filho”, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

AVERY, B.; HAY-SCHMIDT, A.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Embryo development, oocyte morphology, and kinetics of meiotic maturation in bovine oocytes exposed to 6-dimethylaminopurine prior to *in vitro* maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 50, p. 334-344, 1998.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; SIRARD, M.A. The impact of reactive species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. **Journal of Andrology**, v. 18, p. 454-460, 1997.

BRISON, D.R.; SCHULTZ, R.M. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 1088-1096, 1997.

CAAMAÑO, J.N.; RYOO, Z.Y.; THOMAS, J.A. Youngs CR  $\beta$ -mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine *in vitro*-matured/in-vitro fertilised embryos. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1179-1184, 1996.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology**, v. 53, p. 761-771, 2000.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F.; BALDASSARRE, H. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, p. 432-436, 1995.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F.; MARTINEZ, A.G.; MATKOVIC, M. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 451-457, 1996.

FLEMING, T.P. A quantitative analysis of cell allocation to trophectoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst. **Developmental Biology**, v. 119, p. 520-531, 1987.

GUYADER-JOLI, C.; GUERIN, P.; RENARD, J.P.; GUILLAUD, J.; PONCHON, S.; MÉNÉZO, Y. Precursors of taurine in female genital tract: effects on developmental capacity of bovine embryo produced *in vitro*. **Amino Acids**, v. 15, p. 27-42, 1998.

HASHIMOTO, S.; MINAMI, N.; TAKAKURA, R.; IMAI, H. Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1696-1701, 2002.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 23-32, 1997.

IWASAKI, S.; YOSHIBA, N.; USHIJIMA, H.; WATANABE, S.; NAKAHARA, T. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 279-85, 1990.

KIM, N.H.; FUNAHASHI, H.; PRATHER, R.S.; SCHATTEN, G.; DAY, B.N. Microtubule and microfilament dynamics in porcine oocytes during meiotic maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 43, p. 248-255, 1996.

KRISHER, R.L.; BAVISTER, B.D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, v. 49, p. 103-114, 1998.

KUBELKA, M.; MOTLIK, J.; SCHULTZ, R.M.; PAVLOK, A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 292-302, 2000.

LAGUTINA, I.; PONDERATO, N.; LAZZARI, G.; GALLI, C. Kinetics of oocyte maturation and subsequent development of IVF, parthenogenetic, and NT bovine embryos after meiotic inhibition with roscovitine. **Cloning and Stem Cells**, v. 4, p. 113-119, 2002.

LANE, M.; GARDNER, D.K. Nonessential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes *in vitro*. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 14, p. 398-403, 1997.

LIM, J.M.; LIOU, S.S.; HANSEL, W. Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of  $\beta$ -mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 46, p. 429-439, 1996.

LIM, J.M.; REGGIO, B.C.; GODKE, R.A.; HANSEL, W. Development of in vitro derived bovine embryos cultured in 5% CO<sub>2</sub> in air or in 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>. **Human Reproduction**, v. 14, p. 458-464, 1999.

LONERGAN, P.; DINNYES, A.; FAIR, T.; YANG, X.; BOLAND, M. Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I. **Molecular Reproduction and Development**, v. 57, p. 204-209, 2000.

MERMILLOD, P.; TOMANEK, M.; MARCHAL, R.; MEIJER, L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 89-95, 2000.

NASR-ESFAHANI, M.H.; AITKEN, J.R.; JOHNSON, M.H. Hydrogen peroxide levels in mouse oocyte and early cleavage stages embryos developed *in vitro* or *in vivo*. **Development**, v. 109, p. 501-507, 1990.

NEUBER, E.; LUETJENS, C.M.; CHAN, A.W.S.; SCHATTEEN, G.M. Analysis of DNA fragmentation of *in vitro* cultured bovine blastocysts using TUNEL. **Theriogenology**, v. 57, p. 2193-2202, 2002.

PONDERATO, N.; LAGUTINA, I.; CROTTI, G.; TURINI, P.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Bovine oocytes treated prior to *in vitro* maturation with a combination of butyrolactone I and roscovitine at low doses maintain a normal development capacity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, p. 579-585, 2001.

RICHARD, F.J.; FORTIER, M.A.; SIRARD, M.A. Role of the cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase in the control of meiotic resumption in bovine oocytes cultured with theca cell monolayers. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 1363-1369, 1997.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLLAND, M.P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 234-248, 2002.

SAEKI, K.; NAGAO, Y.; KISHI, M.; NAGAI, M. Developmental capacity of bovine oocytes following inhibition of meiotic resumption by cycloheximide or 6-dimethylaminopurine. **Theriogenology**, v. 48, p. 1161-1172, 1997.

TAKAHASHI, M.; NAGAI, T.; HAMANO, S.; KUWAYAMA, M.; OKAMURA, N.; OKANO, A. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 228-232, 1993.

WOLF, A. **Estímulo da síntese de glutatona na maturação in vitro de oócitos bovinos e sua influência no desenvolvimento embrionário**. 2005. 101p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia “Júlio de Mesquita Filho”, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

## **CAPÍTULO 4 – AVALIAÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO DE DNA EM EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO* APÓS FECUNDAÇÃO DE OÓCITOS TRATADOS COM INIBIDORES DA MATURAÇÃO NUCLEAR E ANTIOXIDANTES**

**RESUMO** – A apoptose é a forma mais generalizada de morte celular. É caracterizada por uma série de eventos bioquímicos e morfológicos observados no núcleo e no citoplasma das células que entram neste processo. O estresse oxidativo danifica os embriões podendo levar à apoptose. Oócitos bovinos pré-maturados com inibidor de maturação nuclear (butirolactona I ou roscovitina) e maturados *in vitro* com antioxidante (cisteamina ou  $\beta$ -mercaptoetanol) foram fecundados e cultivados *in vitro*. A qualidade embrionária foi avaliada com 168 hpi pela técnica de coloração TUNEL com a contagem de células totais e apoptóticas. Os embriões do grupo cujos oócitos foram maturados com SFB obtiveram a maior porcentagem ( $P < 0,05$ ) de células apoptóticas (5,75%) quando comparado ao grupo CBM (pré-MIV com BSA, butirolactona I e  $\beta$ -mercaptoetanol seguido de MIV com BSA e  $\beta$ -mercaptoetanol) com a menor porcentagem (3,00%). A fragmentação de DNA total dos embriões foi avaliada 168 hpi pela técnica do Cometa e não foi observada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos em relação à frequência e extensão de danos do DNA que variou de 0 a 38,18 %. Concluímos que a taxa de apoptose celular e fragmentação de DNA nos embriões produzidos *in vitro* são maiores naqueles maturados com SFB que com butirolactona I e  $\beta$ -mercaptoetanol.

**Palavras-Chave:** maturação *in vitro*, fecundação *in vitro*, embrião, bovino, antioxidantes, butirolactona I, roscovitina, TUNEL, ensaio Cometa.

### **Introdução**

A apoptose é a forma mais generalizada de morte celular, pois é a que ocorre tanto no desenvolvimento embrionário-fetal como ao longo da vida adulta. O conceito de morte celular por apoptose, contrastando com o de necrose, foi proposto há 26 anos



por KERR e SEARLE (1972): “As células fisiologicamente indesejáveis não necrosam, elas apoptosam”. A morte celular programada é característica no desenvolvimento de animais e plantas. Esse tipo de morte celular é tão importante quanto o processo mitótico no sentido de produzir um indivíduo.

A apoptose é caracterizada por uma série de eventos bioquímicos e morfológicos observados no núcleo e no citoplasma das células que entram neste processo. A condensação e fragmentação do DNA nuclear estão comumente associadas à quebra do DNA nuclear em fragmentos de 200 pares de base. Similarmente, o citoplasma se torna denso e com corpos apoptóticos e vesículas, e é observado ainda peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e aumento do retículo endoplasmático (HALL, 1999).

A apoptose é confirmada *in situ* por meio do ensaio TUNEL, que a enzima terminal “*deoxynucleotidyl transferase*” (TdT) catalisa a incorporação de “biotinylated deoxyuridine” (dUTP) nos locais de quebra de DNA. O sinal é amplificado por fluorescência e a reação detecta preferencialmente células que iniciaram o processo de morte celular. A apoptose é observada em condições normais no início do desenvolvimento de embriões *in vivo* e *in vitro* (NEUBER et al., 2002). O índice de células em apoptose pode indicar a qualidade de blastocistos produzidos.

A técnica de eletroforese de células em microgel é aplicada em muitos estudos relacionados à integridade de DNA e qualidade celular. O ensaio Cometa é baseado no princípio de que danos ao DNA reduzem o tamanho de fragmentos do DNA. Este efeito é detectado aplicando um campo eletroforético para lisar as células. Os fragmentos de DNA corados formam um típico padrão de migração semelhante a um cometa (HELMA e UHL, 2000). A detecção de danos aos fragmentos de DNA pelo ensaio Cometa é um método eficiente para avaliar danos no DNA de células (oócitos ou embriões) submetidos ao estresse oxidativo que ainda pode causar peroxidação de fosfolipídeos de membrana e alterar muitos tipos de moléculas celulares, tais como lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos (NASR-ESFAHANI et al., 1990), podendo levar à alterações mitocondriais, bloqueio de desenvolvimento, depleção do ATP e apoptose (KOWALTOWSKI e VERCESI, 1999; HYSLOP et al., 1988; YANG et al., 1998). O

ensaio Cometa permite a quantificação tanto pelo monitoramento da frequência como pela extensão dos danos ao DNA (TAKAHASHI et al., 2000).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade de embriões através da fragmentação de DNA, obtidos a partir de oócitos cultivados com inibidores da maturação nuclear e antioxidantes, utilizando as técnicas do TUNEL e Cometa.

## **Material e Métodos**

### **Obtenção e seleção dos oócitos**

Os ovários de bovinos abatidos nos abatedouros de Guararapes-SP e Birigüi-SP foram retirados das carcaças aproximadamente 20 minutos após o abate, mantidos em solução salina estéril a 30-35 °C e transportados para o laboratório em caixas térmicas, não excedendo o limite de 6 horas desde o abate até o início das aspirações. As punções foliculares foram realizadas manualmente por meio de agulha de calibre 18-G, adaptada a seringa de 20 mL, ambas descartáveis. Todo o material aspirado foi transferido para tubos plásticos de 50 mL e decantado por 15 minutos para seleção dos oócitos.

O sedimento foi transferido para placas de poliestireno de 60 mm de diâmetro e avaliado em microscópio estereoscópico. Os oócitos com *cumulus* compacto, possuindo pelo menos 4 camadas de células e de aparência saudável (citoplasma de granulação homogênea) foram selecionados para o cultivo de maturação.

### **Maturação dos oócitos**

Os oócitos selecionados foram lavados duas vezes em meio de lavagem H-199 (meio TCM-199 suplementado com 0,2 mM de piruvato, 20 mM de HEPES, 5 mM de bicarbonato de sódio e 75 µg/mL de amicacina) e uma vez em meio de pré-maturação (meio TCM-199 suplementado com 75 µg/mL de amicacina, 0,3% de BSA e 0,2 mM de piruvato). O meio de pré-maturação foi suplementado com 25 µM de roscovitina ou 100 µM de butirolactona I e 50 µM de β-mercaptoetanol ou 50 µM de cisteamina. Somente foram pré-maturados os oócitos dos grupos contendo inibidores da maturação nuclear.

Ao término do cultivo de pré-maturação, os oócitos foram transferidos para placa de cultura contendo meio de maturação B-199 (meio TCM-199 suplementado com 0,2 mM de piruvato, 25 mM de bicarbonato de sódio, 75 µg/mL de amicacina, 1 µg/mL de 17-β estradiol, 0,5 µg/mL de FSH, 100 UI/mL de hCG e 0,6% de BSA) suplementado ou não com 50 µM de β-mercaptoetanol ou 50 µM de cisteamina. Os demais grupos experimentais (sem inibidores da maturação nuclear) foram apenas cultivados em meio de maturação B-199.

Os oócitos de todos os grupos foram cultivados em microgotas de 100 µL de meio recoberto com óleo mineral, em estufa a 38,8°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar e máxima umidade.

### **Fecundação *in vitro***

Após o cultivo de maturação (24 horas para os grupos sem inibidores de maturação nuclear, e 20 horas para os grupos com inibidores), os COCs foram submetidos à fecundação *in vitro*. Foi utilizado sêmen de um único doador da raça Limousin de um único lote. A palheta foi descongelada em banho-maria a 35-37°C durante 30 segundos e lavada por três vezes em 2 mL de meio TL-Sêmen cada vez, adicionado de antibiótico e 2 µL/mL do estoque C, por centrifugação a 750 rpm (270xg), durante 5 minutos. Na última lavagem, 30 µL do sedimento foi recuperado e depositado em um microtubo com 30 µL de meio TALP-FIV, sendo feita avaliação de suas características (motilidade e concentração espermática). A concentração foi ajustada para 25x10<sup>6</sup> espermatozóides vivos por mL, sendo adicionados 4 µL desta diluição para cada gota de fecundação (concentração final de 100 x 10<sup>3</sup> espermatozóides por gota de meio). Após a maturação, os oócitos de cada grupo foram lavados no meio de fecundação (TALP-FIV) suplementado com 10 µg/mL de heparina, 160 µL PHE e 0,6% BSA, sendo então transferidos para as microgotas de fecundação (20 oócitos/microgota). A fecundação foi realizada a 38,8°C, por 24 horas em estufa contendo 5% CO<sub>2</sub> em ar atmosférico e 99% de umidade.

### **Cultivo de desenvolvimento**

Os zigotos foram lavados duas vezes em meio TALP e uma vez no meio mSOF, sendo então transferidos para as microgotas do cultivo de desenvolvimento *in vitro* (CIV). O cultivo de desenvolvimento embrionário foi realizado em microgotas de 100 µL de meio mSOF suplementado com 0,5% de BSA e 2,5% SFB. O cultivo foi conduzido em estufa à temperatura de 38,8°C, contendo 5% de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico e 99% de umidade, durante 7 dias. A cada 48 horas, 50% do meio de cultivo foi renovado. A avaliação do desenvolvimento embrionário foi realizada às 40 horas (clivagem), 168 horas (formação de blastocistos) e 192 horas (blastocistos eclodidos e em processo de eclosão) pós-inseminação (hpi).

### **Coloração “Terminal Transferase Assay” - TUNEL**

As células em apoptose dos embriões foram marcadas pela coloração “*In situ* terminal deoxinucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay” (TUNEL), descrita por PAULA-LOPES e HANSEN (2002). Os blastocistos foram lavados por quatro vezes em 100 µL de PBS com PVP (1 mg/mL) (PBS-PVP) e posteriormente fixados, com a zona pelúcida intacta, em 100 µL de solução de paraformaldeído (4% em PBS, pH 7,4) a temperatura ambiente por 1 hora. Os embriões foram lavados em PBS-PVP e foram armazenados sob refrigeração (4°C), por 1 a 7 dias, para posterior processamento. Estes embriões foram então permeabilizados em solução de Triton X-100 (0,5%, v/v) em citrato de sódio (0,1%), por 30 minutos em temperatura ambiente. Os embriões reservados para controle positivo foram incubados com DNase I (50 UI/mL de água Milli-Q) (RNase free) a 37°C por 1 hora, enquanto que os embriões dos tratamentos ficaram em gotas de 100 µL de PBS-PVP. Posteriormente, todos os embriões foram lavados em PBS-PVP e incubados, em câmara úmida, com 15 µL da mistura (1:9, da enzima – tubo 1 e do tampão da enzima – tubo 2, respectivamente) para a coloração TUNEL (*In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche Diagnostics, Germany), por 1 hora a 37°C no escuro. Os embriões reservados para controle negativo foram incubados na ausência da enzima “terminal deoxinucleotidyl transferase” (TdT) (tubo 1, contida no kit). Os embriões foram incubados em RNase A

(50 µg/mL de água Milli-Q) por 1 hora em temperatura ambiente, seguida por incubação com iodeto de propídio (0,5 µg/mL de PBS-PVP) por 30 minutos em temperatura ambiente. Por fim, estes embriões foram lavados em PBS-PVP e colocados entre lâmina e lamínula com glicerina tamponada (9:1). Os blastocistos foram avaliados em microscópio de epifluorescência (excitação de 510-550nm e emissão de 590nm) quanto ao número de células com fragmentação de DNA (TUNEL positivas – fluorescência verde ou amarela pontual dentro do núcleo) localizadas na MCI ou no TF em relação ao número total de células do blastocisto, determinado pelos núcleos corados em vermelho pelo iodeto de propídeo.

### **Ensaio Cometa**

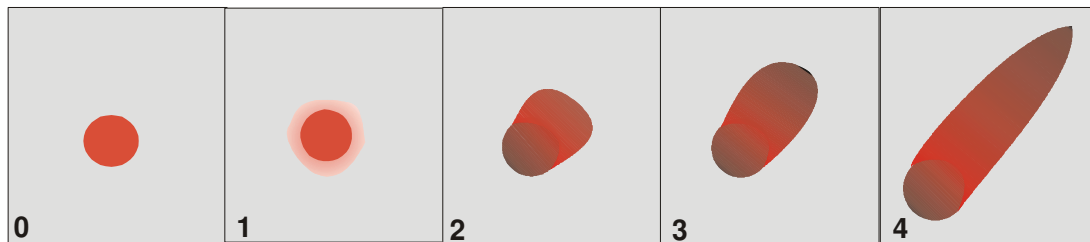
Os embriões provenientes de oócitos maturados nos diferentes meios de cultivo foram colhidos e lavados em TCM-199 Hepes com 10% de SFB, e posteriormente lavados em gel de agarose “low melting point” (LMP) (0,75%) a uma temperatura de 37°C e depositados enfileirados sobre lâmina. A lâmina foi deixada sob câmara úmida a 4°C por 10 minutos, e em seguida foi recoberta com mais 1 mL de gel de ágar (1%).

A lâmina preparada foi deixada dentro de uma câmara úmida a 4°C por mais 30 minutos para polimerização do gel, sendo posteriormente colocada em solução de lise [Tris (10 mM), Triton X-100 (1%), Na<sub>2</sub>EDTA (100 mM), Proteinase K (5 µg/mL), NaCl 2,5 (mM) por 2 horas a 50°C. Após a lise, a lâmina foi colocada em solução de eletroforese altamente alcalina pH 13-14 [NaOH (300 mM, Na<sub>2</sub>EDTA (1 mM)] por vinte minutos para separação das fitas de DNA. Finalmente, correu-se o gel a 1,5 Volts por cm, com amperagem de 200 a 350 mA.

A lâmina foi lavada com solução de Tris-HCl (0,4 M) para neutralizar a reação e em seguida o gel foi corado com brometo de etídeo (10 µg/mL) durante 15 minutos. As lâminas foram visualizadas em microscópio equipado com epifluorescência (Microscópio Olympus IX51-III; excitação 340 a 380 nm e emissão 430 nm).

Os embriões destinados ao ensaio Cometa foram avaliados a partir do comprimento da cauda e intensidade de coloração do núcleo. Foram classificados de acordo com a migração do DNA: C(0) sem migração de DNA, C(1) com um pequeno

halo a sua volta, C(2) com uma pequena cauda e núcleo bem corado, C(3) com a cauda de tamanho médio e núcleo parcialmente corado e C(4) com o núcleo quase totalmente descorado e cauda longa (ANDERSON et al., 1994; VISVARDIS et al., 1997). Esta classificação pode ser visualizada na Figura 1:



**Figura 1** - Classificação da integridade de DNA total (Modificado de ANDERSON et al., 1994 e VISVARDIS et al., 1997). (0) célula onde ocorreu pouca quebra de DNA e apenas difusão do DNA no gel, (1) pequena quebra e pouca migração de DNA, (2) quebra e migração parcial de DNA, (3) quebra e migração de DNA acentuada e (4) grande quebra e alta migração de DNA.

### **Delineamento experimental**

Os oócitos foram pré-maturados em meio suplementado com 0,3% de BSA e 25  $\mu$ M de roscovitina ou 100  $\mu$ M de butirolactona I, e 50  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol ou 50  $\mu$ M de cisteamina. Depois foram maturados em meio B-199 suplementado com 0,6% de BSA e 50  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol ou 50  $\mu$ M de cisteamina conforme grupos experimentais abaixo:

#### **Pré-Maturação:**

TCM-199 suplementado com 0,3% de BSA + 25  $\mu$ M de roscovitina (**R**);

TCM-199 suplementado com 0,3% de BSA + 25  $\mu$ M de roscovitina + 50  $\mu$ M de cisteamina (**RC**);

TCM-199 suplementado com 0,3% de BSA + 25  $\mu$ M de roscovitina + 50  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol (**RM**);

TCM-199 suplementado com 0,3% de BSA + 100  $\mu$ M de butirolactona I (**B**);

TCM-199 suplementado com 0,3% de BSA + 100  $\mu$ M de butirolactona I + 50  $\mu$ M de cisteamina **(BC)**;

TCM-199 suplementado com 0,3% de BSA + 100  $\mu$ M de butirolactona I + 50  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol **(BM)**;

**Maturação:**

- |                |   |   |
|----------------|---|---|
| SEM<br>PRÉ-MIV | { | <p><b>(S)</b> → B-199 suplementado com 10% de SFB (PADRÃO);</p> <p><b>(C)</b> → B-199 suplementado com 0,6% de BSA (CONTROLE);</p> <p><b>(CC)</b> → B-199 suplementado com 0,6% de BSA + 50 <math>\mu</math>M de cisteamina;</p> <p><b>(CM)</b> → B-199 suplementado com 0,6% de BSA + 50 <math>\mu</math>M de <math>\beta</math>-mercaptoetanol;</p>   |
| COM<br>PRÉ-MIV | { | <p><b>(CR)</b> → B-199 suplementado com 0,6% de BSA</p> <p><b>(CRC)</b> → B-199 suplementado com 0,6% de BSA + 50 <math>\mu</math>M de cisteamina</p> <p><b>(CRM)</b> → B-199 suplementado com 0,6% de BSA + 50 <math>\mu</math>M de <math>\beta</math>-mercaptoetanol</p> <p><b>(CB)</b> → B-199 suplementado com 0,6% de BSA</p> <p><b>(CBC)</b> → 199 suplementado com 0,6% de BSA + 50 <math>\mu</math>M de cisteamina</p> <p><b>(CBM)</b> → B-199 suplementado com 0,6% de BSA + 50 <math>\mu</math>M de <math>\beta</math>-mercaptoetanol</p> |

**Experimento I: Avaliação da fragmentação de DNA pela coloração “Terminal Transferase Assay” - TUNEL**

Neste experimento, os oócitos depois de maturados (24 horas para os grupos sem inibidores de maturação nuclear, e 20 horas para os grupos com inibidores), foram submetidos à fecundação por 24 horas. Os zigotos foram cultivados *in vitro* em meio SOF-Modificado, suplementado com 0,5% de BSA e 2,5% de SFB. Os embriões foram avaliados as 168 hpi pela técnica do TUNEL para determinação do número de células totais e apoptóticas.

## **Experimento II: Avaliação da fragmentação de DNA pelo ensaio Cometa**

Neste experimento, os oócitos foram maturados, fecundados e cultivados nas mesmas condições descritas anteriormente. Os embriões foram avaliados as 168 hpi pela técnica do Cometa para verificação da fragmentação de DNA total.

### **Análise Estatística**

Para avaliação do efeito da suplementação do meio de cultura com inibidores da maturação nuclear e antioxidantes sobre fragmentação de DNA do embrião através das técnicas do TUNEL e Cometa, os dados foram analisados pela fração de oócitos que atingiram o estágio de blastocisto com 168 hpi, reportados em termos de porcentagem (%). Como a porcentagem de blastocistos não obteve distribuição normal, os dados foram transformados em  $\arcsin \sqrt{\%}$ . No experimento I, foi aplicada análise de variância (ANOVA) para comparação dos tratamentos e posteriormente foi aplicado teste de Tukey para comparação múltipla das médias. No experimento II, foi aplicada análise de variância (ANOVA) para comparação dos tratamentos, em cada uma das classes de fragmentação de DNA do embrião, e posteriormente foi aplicado teste de Tukey para comparação múltipla das médias.

O nível de significância adotado foi de 5%. A análise estatística foi efetuada empregando-se o sistema SAS (Statistical Analysis System).

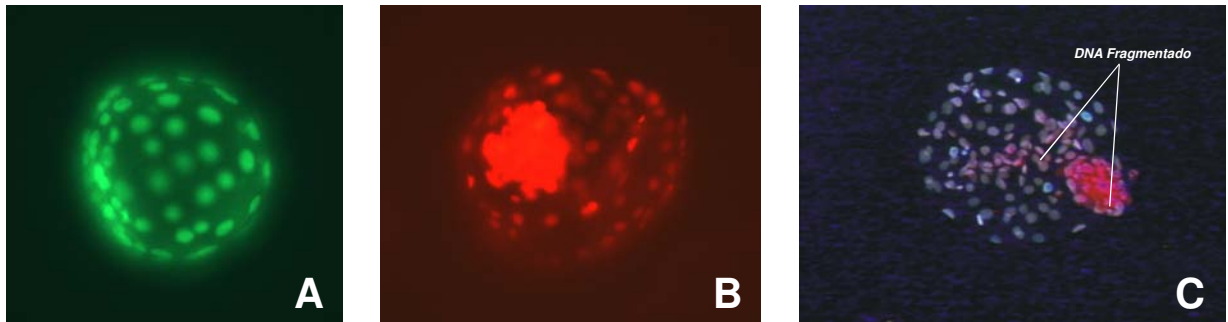
## **Resultados**

### **Experimento I: Avaliação da fragmentação de DNA pela coloração “Terminal Transferase Assay” – TUNEL**

Os blastocistos desenvolvidos após 168 horas de cultivo *in vitro* foram observados pela coloração TUNEL em microscópio epifluorescente, sendo que as células TUNEL positivas apresentaram fluorescência verde ou amarela pontual dentro do núcleo, localizada na MCI ou no TF em relação ao número total de células do blastocisto, determinado pelos núcleos corados em vermelho pelo iodeto de propídeo (Figura 2). O grupo de oócitos pré-maturados com SFB apresentou maior porcentagem



(5,75%) de células em apoptose quando comparado com o grupo CBM (pré-MIV BSA + B +  $\beta$ ME / MIV BSA +  $\beta$ ME) que obteve apenas 3,00% ( $P < 0,05$ ), não diferindo dos demais grupos (Tabela 1 e Figura 3).

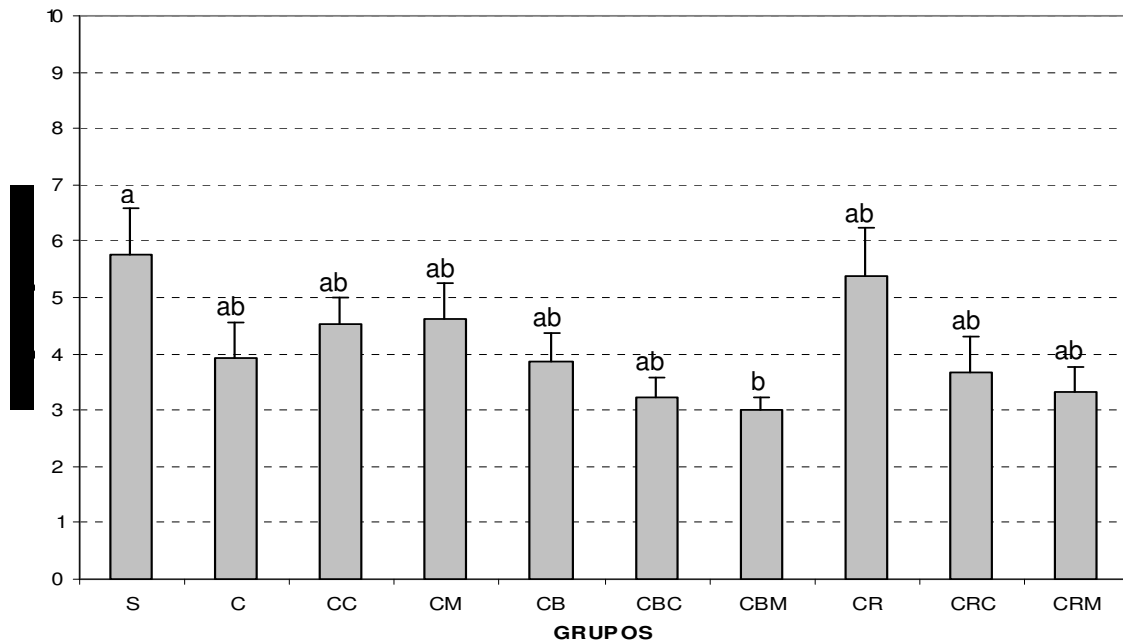


**Figura 2** – Blastocistos corados pela técnica de coloração TUNEL, 168 horas após FIV, observados em microscópio de epifluorescência. A) Controle Positivo TUNEL – tratados com DNase I; B) Controle Negativo TUNEL – tratados sem TdT; C) Blastocisto que apresentou fragmentação do DNA. As setas demonstram locais da quebra do DNA dentro do núcleo. (TdT – enzima “terminal deoxinucleotidyl transferase”).

**Tabela 1** – Porcentagem de células em apoptose verificadas pela técnica do TUNEL e tamanho (número médio de células/blastocisto) de embriões produzidos de oócitos maturados em diferentes meios.

Grupos	Apoptose (TUNEL) Média (%) $\pm$ EPM	Média Células/BI $\pm$ EPM
S	5 (5,75 $\pm$ 0,82) <sup>a</sup>	81 $\pm$ 3,85 <sup>a</sup>
C	3 (3,93 $\pm$ 0,64) <sup>ab</sup>	79 $\pm$ 2,89 <sup>a</sup>
CC	4 (4,53 $\pm$ 0,48) <sup>ab</sup>	81 $\pm$ 2,74 <sup>a</sup>
CM	4 (4,62 $\pm$ 0,64) <sup>ab</sup>	83 $\pm$ 3,26 <sup>a</sup>
CB	3 (3,87 $\pm$ 0,49) <sup>ab</sup>	77 $\pm$ 2,65 <sup>a</sup>
CBC	3 (3,24 $\pm$ 0,34) <sup>ab</sup>	81 $\pm$ 2,53 <sup>a</sup>
CBM	2 (3,00 $\pm$ 0,23) <sup>b</sup>	77 $\pm$ 2,52 <sup>a</sup>
CR	4 (5,38 $\pm$ 0,84) <sup>ab</sup>	82 $\pm$ 4,35 <sup>a</sup>
CRC	3 (3,68 $\pm$ 0,62) <sup>ab</sup>	77 $\pm$ 3,87 <sup>a</sup>
CRM	3 (3,32 $\pm$ 0,44) <sup>ab</sup>	79 $\pm$ 5,32 <sup>a</sup>

<sup>ab</sup> Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de ANOVA ( $P < 0,05$ ).

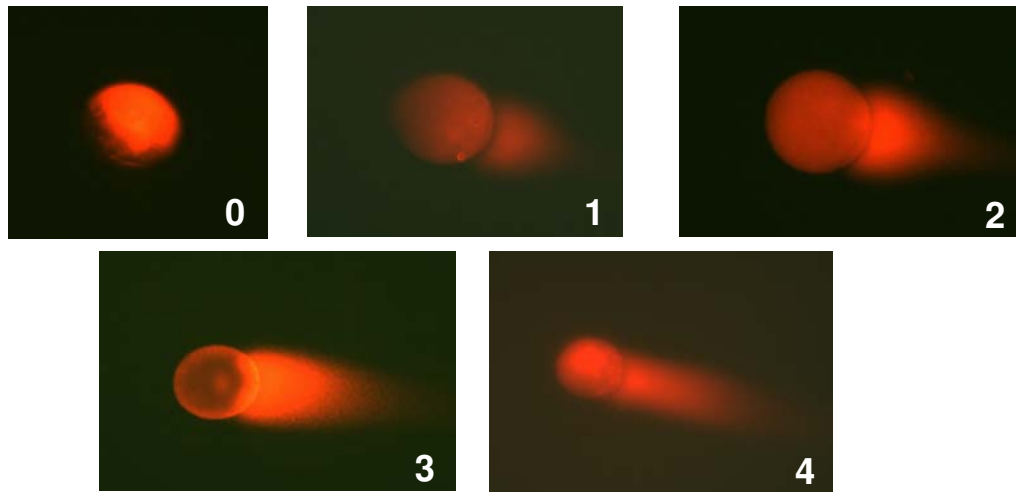


**Figura 3** – Percentual de fragmentação do DNA encontradas em blastocistos corados por TUNEL após 168 horas de fecundação dos oócitos maturados em diferentes meios. **S**= SFB (10%), **C**= BSA (0,6%), **CC**= BSA (0,6%) + CIS (50  $\mu$ M), **CM**= BSA (0,6%) +  $\beta$ ME (50  $\mu$ M), **CB**= pré-MIV BSA (0,3%) + B (100  $\mu$ M) / MIV BSA (0,6%); **CBC**= pré-MIV BSA (0,3%) + B (100  $\mu$ M) + CIS (50  $\mu$ M) / MIV BSA (0,6%) + CIS (50  $\mu$ M), **CBM**= pré-MIV BSA (0,3%) + B (100  $\mu$ M) +  $\beta$ ME (50  $\mu$ M) / MIV BSA (0,6%) +  $\beta$ ME (50  $\mu$ M), **CR**= pré-MIV BSA (0,3%) + R (25  $\mu$ M) / MIV BSA (0,6%); **CRC**= pré-MIV BSA (0,3%) + R (25  $\mu$ M) + CIS (50  $\mu$ M) / MIV BSA (0,6%) + CIS (50  $\mu$ M), **CRM**= pré-MIV BSA (0,3%) + R (25  $\mu$ M) +  $\beta$ ME (50  $\mu$ M) / MIV BSA (0,6%) +  $\beta$ ME (50  $\mu$ M).

<sup>ab</sup> Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de ANOVA ( $P < 0,05$ ).

### Experimento II: Avaliação da fragmentação de DNA pelo ensaio Cometa

Os blastocistos foram corados pela técnica do Cometa após 168 horas de cultivo *in vitro*, observados em microscópio epifluorescente e avaliados a partir do comprimento da cauda e intensidade de coloração dos núcleos (Figura 4). A classificação foi feita em classes de acordo com a de ANDERSON et al., 1994 e VISVARDIS et al., 1997. Os blastocistos não apresentaram diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos em relação à frequência e extensão de danos do DNA. Os percentuais e as médias da fragmentação de DNA total dos embriões estão demonstrados na tabela 2.



**Figura 4** – Classes de fragmentação de DNA em blastômeros de blastocistos produzidos 168 horas após FIV.

**Tabela 2** – Porcentagem de fragmentação de DNA total de embriões submetidos à técnica do Cometa provenientes de oócitos maturados em diferentes meios.

Grupos	Classificação Cometa				
	Média (%) ± EPM				
	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
S	5 (7,05 ± 4,32) <sup>a</sup>	18 (23,79 ± 8,89) <sup>a</sup>	19 (27,72 ± 5,99) <sup>a</sup>	12 (18,98 ± 6,82) <sup>a</sup>	18 (22,47 ± 12,93) <sup>a</sup>
C	4 (6,41 ± 2,11) <sup>a</sup>	12 (20,43 ± 6,32) <sup>a</sup>	22 (38,18 ± 5,69) <sup>a</sup>	12 (19,14 ± 3,01) <sup>a</sup>	10 (15,84 ± 6,61) <sup>a</sup>
CC	1 (1,52 ± 1,52) <sup>a</sup>	7 (24,53 ± 15,50) <sup>a</sup>	14 (26,71 ± 7,90) <sup>a</sup>	15 (29,25 ± 6,87) <sup>a</sup>	11 (17,99 ± 8,48) <sup>a</sup>
CM	4 (5,74 ± 4,46) <sup>a</sup>	9 (17,47 ± 10,21) <sup>a</sup>	19 (33,26 ± 6,99) <sup>a</sup>	14 (29,84 ± 8,19) <sup>a</sup>	4 (13,69 ± 8,27) <sup>a</sup>
CB	5 (10,48 ± 5,04) <sup>a</sup>	13 (22,76 ± 6,29) <sup>a</sup>	17 (27,38 ± 4,46) <sup>a</sup>	21 (30,57 ± 7,42) <sup>a</sup>	6 (8,81 ± 4,67) <sup>a</sup>
CBC	11 (17,39 ± 8,04) <sup>a</sup>	17 (27,51 ± 7,52) <sup>a</sup>	17 (26,27 ± 7,16) <sup>a</sup>	12 (18,29 ± 7,95) <sup>a</sup>	6 (10,54 ± 7,05) <sup>a</sup>
CBM	14 (23,36 ± 10,96) <sup>a</sup>	12 (21,87 ± 6,38) <sup>a</sup>	15 (26,22 ± 8,50) <sup>a</sup>	11 (21,13 ± 8,81) <sup>a</sup>	4 (7,41 ± 4,04) <sup>a</sup>
CR	7 (27,50 ± 9,46) <sup>a</sup>	4 (14,17 ± 10,03) <sup>a</sup>	6 (19,44 ± 9,04) <sup>a</sup>	10 (31,35 ± 12,22) <sup>a</sup>	3 (7,54 ± 5,01) <sup>a</sup>
CRC	1 (3,33 ± 3,33) <sup>a</sup>	7 (20,69 ± 5,49) <sup>a</sup>	13 (36,67 ± 4,71) <sup>a</sup>	11 (33,19 ± 6,24) <sup>a</sup>	2 (6,11 ± 3,89) <sup>a</sup>
CRM	6 (18,06 ± 6,24) <sup>a</sup>	5 (15,28 ± 6,94) <sup>a</sup>	9 (31,94 ± 4,52) <sup>a</sup>	9 (34,72 ± 10,19) <sup>a</sup>	0 (0,00 ± 0,00) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de ANOVA (P>0,05).

## Discussão

### **Experimento I: Avaliação da fragmentação de DNA pela coloração “Terminal Transferase Assay” – TUNEL**

O número de células embrionárias e o percentual de morte celular ou apoptose são usuais indicadores da qualidade embrionária. Quanto maior o número de células e menor a taxa de apoptose, melhor a qualidade do embrião. A apoptose no início do desenvolvimento embrionário é observada sob condições *in vivo* e *in vitro*. O embrião pode apresentar apoptose em blastômeros inviáveis, durante a formação da blastocela, ou ainda em condições de estresse durante o cultivo *in vitro*. A apoptose é caracterizada por uma série de eventos bioquímicos e morfológicos observados no núcleo e no citoplasma das células que entram neste processo. A condensação e fragmentação do DNA nuclear estão comumente associadas à quebra do DNA nuclear em fragmentos de 200 pares de base (HALL, 1999). A reação TUNEL (GAVRIELI et al., 1992) possibilita a detecção *in situ* de células apoptóticas apontando uma extensiva fragmentação de DNA oligonucleossomal gerada pela atividade de DNase endógena durante o processo de apoptose.

O percentual reduzido de células em apoptose observadas em todos os tratamentos indicou que nossas condições de cultivo embrionário foram satisfatórias. O grupo de oócitos maturados com SFB apresentou maior porcentagem de células em apoptose quando comparado àqueles maturados com butirolactona I e  $\beta$ -mercaptoetanol. BAVISTER et al. (1992) relataram que o SFB possui citocinas e fatores de crescimento que estimulam a divisão mitótica. Desta maneira, embriões provenientes de oócitos maturados com SFB clivam mais rapidamente, e provavelmente, essa velocidade de clivagem tenha correlação com maior taxa de fragmentação de DNA, e conseqüentemente com apoptose. Outro fator importante relacionado à apoptose se refere ao estresse oxidativo, que pode variar dependendo do sistema de cultivo e dos fatores de crescimento presentes no SFB (YOUNG et al., 1998). VAN SOOM et al. (2002) relataram que a apoptose *in vitro* pode ser induzida pela presença de radicais livres do oxigênio. Desta maneira, a maior porcentagem de

células em apoptose dos embriões de oócitos maturados com SFB pode ter ocorrido por duas hipóteses: 1) o SFB possui fatores de crescimento que estimulam a divisão mitótica levando os embriões à clivagem mais rapidamente e maior taxa de fragmentação de DNA e 2) algumas substâncias presentes no SFB, de composição indefinida, e o sistema de cultivo podem levar ao estresse oxidativo e induzir a apoptose.

Apesar de ser o grupo com maior taxa de apoptose, os oócitos maturados com SFB produziram o maior número de blastocistos com 168 e 192 horas de cultivo. PORTER et al. (2001) colocaram que o fato de oócitos maturados com SFB produzir mais embriões seja devido aos fatores de crescimento e proteínas que este possa conter, entretanto esses embriões têm menor integridade de DNA e estão mais suscetíveis à apoptose, o que é um indicativo de menor qualidade embrionária.

A adição de antioxidantes exerce uma influência positiva sobre o desenvolvimento embrionário de bovinos, aumentando a concentração intracelular de GSH no oócito e o número de células (VAN SOOM et al., 2002). Em nosso estudo, a associação da butirolactona I e  $\beta$ -mercaptoetanol foi benéfica aos embriões que apresentaram menor porcentagem de células em apoptose. Entretanto, não observamos um efeito positivo da GSH sobre as taxas de produção embrionária e redução das células em apoptose para os grupos de oócitos maturados com cisteamina e  $\beta$ -mercaptoetanol que apresentaram as mesmas taxas de células apoptóticas dos grupos controle com BSA e SFB, assim como VAN SOOM et al. (2002) e WOLF (2005) que não observaram este efeito positivo. As condições de cultivo, como a tensão de oxigênio e a composição do meio, podem ter influência no efeito positivo da adição dos antioxidantes no desenvolvimento embrionário.

### **Experimento II: Avaliação da fragmentação de DNA pelo ensaio Cometa**

A detecção de danos nos fragmentos de DNA pelo ensaio Cometa é um método proveitoso para avaliar um dos efeitos prejudiciais ocasionados pelo estresse oxidativo ou outras condições de cultivo embrionário que podem comprometer o desenvolvimento

embrionário. O ensaio Cometa permite a quantificação dos danos de DNA monitorando tanto a frequência como a extensão dos danos ao DNA (TAKAHASHI et al., 2000).

Em nosso estudo, os blastocistos não apresentaram diferença entre os tratamentos em relação à frequência e extensão de danos causados ao DNA. Observamos que a incidência de fragmentação de DNA de classe 4 (que caracteriza grande quebra e alta migração de DNA) não foi muito alta para todos os grupos, indicando que nossas condições de cultivo embrionário foram satisfatórias. TAKAHASHI et al. (2000) relatam que o ensaio Cometa é uma boa técnica para se avaliar a qualidade do meio de cultura e seus aditivos.

Apesar de não haver diferença entre os tratamentos, observamos que a grande fragmentação e alta migração de DNA representada pela classe 4 foram maiores no grupo de oócitos maturados com SFB, ao passo que, pouca quebra de DNA (classe 0) foi verificada nos grupos com butirrolactona I e  $\beta$ -mercaptoetanol e com roscovitina. Este resultado teve uma correlação com os nossos achados dos embriões submetidos à técnica do TUNEL, no qual o grupo de oócitos maturados com SFB apresentou maior porcentagem de células em apoptose que o grupo com butirrolactona I e  $\beta$ -mercaptoetanol. Observamos que as duas técnicas utilizadas (TUNEL e Cometa) foram igualmente eficientes e demonstraram resultados coerentes. Estas considerações são relevantes quando YANG et al., 1998 relataram que os danos causados ao DNA possam resultar em apoptose. Como visto anteriormente, embriões cultivados em SFB clivam mais rapidamente podendo ter correlação com maior taxa de fragmentação de DNA, e conseqüentemente com apoptose (BAVISTER et al., 1992).

Parece que a fragmentação de DNA e a apoptose podem ser prejudiciais ao desenvolvimento embrionário. Entretanto, o grupo do SFB apresentou a maior produção de blastocistos. HARDY (1999) colocou que a morte celular nos embriões pode ser um mecanismo para eliminar células anormais e células com potencial de desenvolvimento impróprio. Os embriões maturados em SFB, por clivarem mais rapidamente, necessitam de um mecanismo fisiológico que elimine o excesso de células (principalmente as de má qualidade) para garantir a sua produção.

Além da quantidade de embriões produzidos, a morte celular pode estar relacionada com a qualidade do embrião. Acredita-se que blastocistos com grande número de células tenham maior probabilidade de implantar e dar origem à descendência (VAN SOOM et al., 1997). Blastocistos com número reduzido de células tem uma incidência alta e variável de fragmentação de DNA (BYRNE et al., 1999; HARDY et al., 1989). Entretanto, HARDY, (1999) e JURISICOVA et al. (1998) levantaram a hipótese de que a morte celular, após certo patamar, é prejudicial para o desenvolvimento embrionário.

### **Conclusões**

A taxa de apoptose celular e fragmentação de DNA nos embriões produzidos *in vitro* são maiores naqueles maturados com SFB que com butirolactona I e  $\beta$ -mercaptoetanol.

O bloqueio meiótico e a associação aos antioxidantes cisteamina e  $\beta$ -mercaptoetanol não interferiram na apoptose.

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ANDERSON, D.; YU, T.-W.; PHILLIPS, B.J.; SCHMEZER, P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet Assay. **Mutation Research**, v. 307, p. 261-271, 1994.

BAVISTER, B.D.; ROSE-HELLEKANT, T.A.; PINYOPUMMINTR, T. Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. **Theriogenology**, v. 37, p. 127-146, 1992.

BYRNE, A.T.; SOUTHGATE, J.; BRISON, D.R.; LEESE, H.J. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 117, p. 97-105, 1999.

GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN SASSON, S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **Journal of Cellular Biology**, v. 119, p. 493-501, 1992.

HALL, A.G. The role of glutathione in the regulation of apoptosis. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 29, p. 238-245, 1999.

HARDY, K. Apoptosis in the human embryo. . **Reviews of Reproduction**, v. 4, p. 125-134, 1999.

HARDY, K.; HANDYSIDE, A.H.; WINSTON, R.M.L. The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development *in vitro*. **Development**, v. 107, p. 597-604, 1989.

HELMA, C.; UHL, M. A public domain image-analysis program for the single-cell gel-electrophoresis (comet) assay. **Mutation Research**, v. 466, p. 9-15, 2000.

HYSLOP, P.A.; HINSHAW, D.B.; HALSEY, W.A.Jr.; SCHRAUFSTATTER, I.U.; SAUERHEBER, R.D.; SPRAGG, R.G.; JACKSON, J.H.; COCHRANE, C.G. Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 1665-1675, 1988.

JURISICOVA, A.; ROGERS, I.; FASCIANI, A.; CASPER, R.F.; VARMUZA, S. Effects of maternal age and conditions of fertilization on programmed cell death during murine preimplantation development. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, p. 139-145, 1998.

KERR, J.F.; SEARLE, J. The digestion of cellular fragments within phagolysosomes in carcinoma cells. **Journal of Pathology**, v. 108, p. 55-8, 1972.

KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biological Medicine**, v. 26, p. 463-471, 1999.

NASR-ESFAHANI, M.H.; AITKEN, J.R.; JOHNSON, M.H. Hydrogen peroxide levels in mouse oocyte and early cleavage stages embryos developed *in vitro* or *in vivo*. **Development**, v. 109, p. 501-507, 1990.

NEUBER, E.; LUETJENS, C.M.; CHAN, A.W.S.; SCHATTEEN, G.M. Analysis of DNA fragmentation of *in vitro* cultured bovine blastocysts using TUNEL. **Theriogenology**, v. 57, p. 2193-2202, 2002.

PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Heat shock- induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1169-77, 2002.

PORTER, D.A.; HARMAN, R.M.; COWAN, R.G.; QUIRK, S.M. Susceptibility of ovarian granulosa cells to apoptosis differs in cells isolated before or after the preovulatory LH surge. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 176, p. 13-20, 2001.



TAKAHASHI, M.; KEICHO, K.; TAKAHASHI, H.; OGAWA, H.; SCHULTZ, R.M.; OKANO, A. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in *in vitro* cultured bovine embryos by comet assay. **Theriogenology**, v. 54, p. 137-145, 2000.

VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.; DE KRUIF, A. Relationship between timing of development, mórula morphology and cell allocation of the inner cell mass and trophoctoderm in *in vitro* produced embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 47, p. 47-56, 1997.

VAN SOOM, A.; YUAN, Y.Q.; PEELMAN, L.J.; DE MATOS, D.G.; DEWULF, J.; LAEVENS, H.; DE KRUIF, A. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with ou without cysteine addition. **Theriogenology**, v. 57, p. 1453-1465, 2002.

VISVARDIS, E.E.; TASSIOU, A.M.; PIPERAKIS, S.M. Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and "gama"-radiation with the alkaline comet assay. **Mutation Research**, v. 383, p. 71-80, 1997.

WOLF, A. **Estímulo da síntese de glutationa na maturação in vitro de oócitos bovinos e sua influência no desenvolvimento embrionário**. 2005. 101p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia "Júlio de Mesquita Filho", Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

YANG, X.; KUBOTA, C.; SUZUKI, H.; TANEJA, M.; BOLS, P.E.J.; PRESICCE, G.A. Control of oocyte maturation in cows – Biological factors. **Theriogenology**, v. 49, p. 471-482, 1998.

YOUNG, L.E.; SINCLAIR, D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Reviews of Reproduction**, v. 3, p. 155-163, 1998.