

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE TRANSPORTE COM  
ANTIOXIDANTES E MODULADORES DE AMP CÍCLICO  
COMO ESTRATÉGIA PARA MELHORAR A QUALIDADE DE  
OÓCITOS BOVINOS DESTINADOS À PRODUÇÃO *IN VITRO*  
DE EMBRIÕES**

**Marcela Ambrogi**

Médica Veterinária

2016

**D  
I  
S  
S.**

**/**

**A  
M  
B  
R  
O  
G  
I**

**M.**

**2  
0  
1  
6**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE TRANSPORTE COM  
ANTIOXIDANTES E MODULADORES DE AMP CÍCLICO  
COMO ESTRATÉGIA PARA MELHORAR A QUALIDADE DE  
OÓCITOS BOVINOS DESTINADOS À PRODUÇÃO *IN VITRO*  
DE EMBRIÕES**

**Marcela Ambrogi**

Médica Veterinária

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE TRANSPORTE COM  
ANTIOXIDANTES E MODULADORES DE AMP CÍCLICO  
COMO ESTRATÉGIA PARA MELHORAR A QUALIDADE DE  
OÓCITOS BOVINOS DESTINADOS À PRODUÇÃO *IN VITRO*  
DE EMBRIÕES**

**Marcela Ambrogi**

**Orientadora: Profa. Adj. Gisele Zoccal Mingoti**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal

2016

Ambrogi, Marcela  
A495s Suplementação do meio de transporte com antioxidantes e moduladores de AMP cíclico como estratégia para melhorar a qualidade de oócitos bovinos destinados à produção *in vitro* de embriões / Marcela Ambrogi. – – Jaboticabal, 2016  
xi, 103 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016  
Orientadora: Gisele Zoccal Mingoti  
Banca examinadora: Fernanda da Cruz Landim, Joaquim Mansano Garcia  
Bibliografia

1. Bloqueadores da meiose. 2. Maturação *in vitro*. 3. Antioxidantes.  
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:591.162:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE TRANSPORTE COM ANTIOXIDANTES E  
MODULADORES DE AMPc COMO ESTRATÉGIA PARA MELHORAR A QUALIDADE DE OÓCITOS BOVINOS DESTINADOS À PRODUÇÃO *IN VITRO*  
DE EMBRIÕES  
AUTORA: MARCELA AMBROGI  
ORIENTADORA: GISELE ZOCCAL MINGOTI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI  
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / FMV / UNESP Araçatuba

Profa. Dra. FERNANDA DA CRUZ LANDIM  
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária / FMVZ / UNESP - Botucatu

Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 06 de junho de 2016.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Marcela Ambrogi– nascida em Taubaté-SP, aos 28 dias do mês de Janeiro de 1988. Concluiu o ensino médio no Colégio Saad, na cidade de Taubaté-SP, em dezembro de 2005. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária, na Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná – UNICENTRO, Câmpus Cedeteg, na cidade de Guarapuava-PR, em março de 2009. Concluiu o ensino superior em Medicina Veterinária em dezembro de 2013. Ingressou no curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, nível de Mestrado e área de concentração de Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Campus de Jaboticabal-SP, em março de 2014, sob orientação da Prof<sup>a</sup> Adj. Gisele Zoccal Mingoti, com bolsa de mestrado da Capes.

## EPÍGRAFE

“Não existe um caminho para a felicidade, a  
felicidade é o caminho.”

Thich Nhat Hanh



## **DEDICO**

Dedico este trabalho à minha mãe e ao meu pai, por todo o amor, dedicação, apoio e incentivo.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por sempre guiar meus passos, iluminar meu caminho e por permitir mais uma conquista.

À minha orientadora Gisele Zocal Mingoti, por toda dedicação, amizade, confiança, incentivo, pelos ensinamentos e pela oportunidade de realizar este trabalho.

À minha mãe e meu pai por todo o carinho, atenção, preocupação, e apoio durante este período. À minha família, por sempre estarem presentes me apoiando.

Às minhas queridas amigas do #labfisiorep Priscila Chediek, Beatriz Leão, Nathália Rocha-Frigoni, Giovana Barros e Melissa Meneghel por toda a ajuda, ensinamentos, amizade e incentivo durante a realização deste projeto. Às estagiárias Luana Rodrigues, Juliana Viegas e Maria Isabela que me ajudaram durante o experimento.

Ao técnico do laboratório Alexandre Teixeira por todo auxílio no laboratório durante a realização do experimento. Ao funcionário Adão Custódio por providenciar o material necessário para realização do experimento.

Aos amigos de Jaboticabal, à República Ouro Fino e à minha grande amiga Mariana Garcia Kako Rodriguez pela amizade e companheirismo.

Aos professores Joaquim Mansano Garcia e Fernanda da Cruz Landim pela participação e contribuição na defesa.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista e ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal pela oportunidade de realizar o mestrado.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista e ao Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal pelas instalações oferecidas para a realização do experimento.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

## **APOIO FINANCEIRO**

Este projeto teve bolsa concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>1</b>
Introdução.....	1
Revisão de Literatura.....	4
Transporte de oócitos.....	4
Antioxidantes.....	5
Maturação de oócitos.....	7
Maturação nuclear.....	8
Maturação citoplasmática.....	9
Suplementação proteica durante a MIV.....	11
Pré-cultivo com inibidores da meiose.....	13
Criopreservação de embriões.....	14
Referências.....	16
<b>CAPÍTULO 2 – SUPLEMENTAÇÃO COM MODULADORES DE AMP<sub>c</sub> E ANTIOXIDANTES DURANTE O TRANSPORTE DE OÓCITOS BOVINOS E SEUS EFEITOS NA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....</b>	<b>23</b>
Resumo.....	23
Introdução.....	26
Material e métodos.....	28
Reagentes químicos.....	28
Obtenção e seleção de oócitos.....	29
Simulação de transporte.....	29

<b>Maturação <i>in vitro</i></b> .....	<b>30</b>
<b>Avaliação da maturação nuclear</b> .....	<b>31</b>
<b>Avaliação da distribuição citoplasmática das mitocôndrias e potencial de membrana mitocondrial</b> .....	<b>31</b>
<b>Mensuração do conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio pelo ensaio com diclorofluoresceína</b> .....	<b>32</b>
<b>Fertilização <i>in vitro</i></b> .....	<b>32</b>
<b>Cultivo embrionário <i>in vitro</i></b> .....	<b>33</b>
<b>Vitrificação e aquecimento dos embriões</b> .....	<b>33</b>
<b>Delineamento experimental</b> .....	<b>34</b>
<b>Análise estatística</b> .....	<b>35</b>
<b>Resultados</b> .....	<b>37</b>
<b>Discussão</b> .....	<b>50</b>
<b>Conclusão</b> .....	<b>55</b>
<b>Referências</b> .....	<b>57</b>

<b>CAPÍTULO 3 – TRANSPORTE DE OÓCITOS BOVINOS EM MEIO SUPLEMENTADO COM DIFERENTES FONTES DE MACROMOLÉCULAS E ANTIOXIDANTES: EFEITOS SOBRE A MATURAÇÃO NUCLEAR E CITOPLASMÁTICA E SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO <i>IN VITRO</i></b> .....	<b>63</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>63</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>63</b>
<b>Material e métodos</b> .....	<b>68</b>
<b>Reagentes químicos</b> .....	<b>68</b>
<b>Obtenção e seleção de oócitos</b> .....	<b>68</b>
<b>Simulação de transporte</b> .....	<b>69</b>
<b>Maturação <i>in vitro</i></b> .....	<b>69</b>
<b>Avaliação da maturação nuclear</b> .....	<b>70</b>
<b>Avaliação da distribuição citoplasmática das mitocôndrias e potencial de membrana mitocondrial</b> .....	<b>71</b>

<b>Mensuração do conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio pelo ensaio com diclorofluoresceína.....</b>	<b>71</b>
<b>Fertilização <i>in vitro</i>.....</b>	<b>72</b>
<b>Cultivo embrionário <i>in vitro</i>.....</b>	<b>72</b>
<b>Vitrificação e aquecimento dos embriões.....</b>	<b>73</b>
<b>Delineamento experimental.....</b>	<b>74</b>
<b>Análise estatística.....</b>	<b>76</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>77</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>91</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>96</b>
<b>Referências.....</b>	<b>97</b>
<b>Considerações Finais .....</b>	<b>103</b>

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2 – MATURAÇÃO NUCLEAR E CITOPLASMÁTICA DE OÓCITOS BOVINOS SUBMETIDOS AO TRANSPORTE SIMULADO EM MEIO SUPLEMENTADO COM INIBIDORES DA MEIOSE

- Tabela 1** - Maturação nuclear em oócitos bovinos cultivados com antioxidantes durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por até mais 18 horas adicionais.....38
- Tabela 2** – Maturação nuclear em oócitos bovinos cultivados com bloqueadores da meiose durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por até mais 18 horas adicionais, em meio livre de inibidor.....39
- Tabela 3**- Concentrações intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS) em oócitos bovinos cultivados com antioxidantes durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil.....41
- Tabela 4**- Concentrações intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS) em oócitos bovinos cultivados com bloqueadores da meiose durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil.....41
- Tabela 5**- Distribuição citoplasmática de mitocôndrias em oócitos bovinos cultivados com antioxidantes durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por mais 18 horas adicionais.....46
- Tabela 6**- Distribuição citoplasmática de mitocôndrias em oócitos bovinos cultivados com bloqueadores da meiose durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por mais 18 horas adicionais, em meio livre de inibidor.....47
- Tabela 7** - Clivagem, desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* a partir de oócitos cultivados com antioxidantes durante o transporte por 6h, seguido de cultivo de maturação *in vitro* por 18h.....49

**Tabela 8** - Clivagem, desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* a partir de oócitos submetidos ao bloqueio da retomada da meiose durante o transporte por 6h, seguido de cultivo de maturação *in vitro* em meio livre de inibidor por 18h.....49

**Tabela 9**- re-expansão após aquecimento e cultivo *in vitro* por 24 horas de embriões bovinos produzidos *in vitro* a partir de oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6 horas em meio suplementado com bloqueadores da meiose e antioxidantes, seguido de cultivo de maturação *in vitro* por 18h.....50

### **CAPÍTULO 3 – TRANSPORTE DE OÓCITOS BOVINOS EM MEIO SUPLEMENTADO COM DIFERENTES FONTES DE MACROMOLÉCULAS E ANTIOXIDANTES: EFEITOS SOBRE A MATURAÇÃO NUCLEAR E CITOPLASMÁTICA E SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO *IN VITRO***

**Tabela 1** - Maturação nuclear em oócitos bovinos cultivados com diferentes macromoléculas (SFB ou BSA) durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por até mais 18 horas adicionais.....78

**Tabela 2** – Maturação nuclear em oócitos bovinos cultivados com antioxidantes durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por até mais 18 horas adicionais.....79

**Tabela 3** - Concentrações intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS) em oócitos bovinos cultivados com diferentes macromoléculas durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por até mais 18 horas adicionais.....81

**Tabela 4** - Concentrações intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS) em oócitos bovinos cultivados com antioxidantes durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por até mais



18	horas
adicionais.....	82
<b>Tabela 5</b> – Potencial de membrana mitocondrial (PMM) em oócitos bovinos cultivados com diferentes macromoléculas durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação <i>in vitro</i> por até mais 18 horas adicionais.....	85
<b>Tabela 6</b> – Potencial de membrana mitocondrial (PMM) em oócitos bovinos cultivados com antioxidantes durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação <i>in vitro</i> por até mais 18 horas adicionais.....	85
<b>Tabela 7-</b> Distribuição citoplasmática de mitocôndrias em oócitos bovinos cultivados com diferentes macromoléculas durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação <i>in vitro</i> por mais 18 horas adicionais.....	87
<b>Tabela 8-</b> Distribuição citoplasmática de mitocôndrias em oócitos bovinos cultivados com antioxidantes durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação <i>in vitro</i> por mais 18 horas adicionais, em meio livre de inibidor.....	88
<b>Tabela 9</b> - Clivagem, desenvolvimento de embriões produzidos <i>in vitro</i> a partir de oócitos cultivados com diferentes macromoléculas durante o transporte por 6h, seguido de cultivo de maturação <i>in vitro</i> por 18h.....	90
<b>Tabela 10</b> - Clivagem, desenvolvimento de embriões produzidos <i>in vitro</i> a partir de oócitos cultivados com antioxidantes durante o transporte por 6h, seguido de cultivo de maturação <i>in vitro</i> por 18h.....	90
<b>Tabela 11-</b> re-expansão após aquecimento e cultivo <i>in vitro</i> por 24 horas de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> a partir de oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6 horas em meio suplementado com diferentes macromoléculas e antioxidantes, seguido de cultivo de maturação <i>in vitro</i> por 18h.....	91

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

- Figura 1** - Representação de oócito bovino em vesícula germinativa no estágio de diplóteno da prófase I, durante o bloqueio meiótico.....9
- Figura 2** – Representação de oócito bovino após o pico de LH in vivo, retomada da meiose e quebra da vesícula germinativa.....9
- Figura 3** – Representação da distribuição das organelas citoplasmáticas no oócito bovino durante a maturação, fertilização e formação do zigoto.....11

### CAPÍTULO 2 – SUPLEMENTAÇÃO COM MODULADORES DE AMP<sub>c</sub> E ANTIOXIDANTES DURANTE O TRANSPORTE DE OÓCITOS BOVINOS E SEUS EFEITOS NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

- Figura 1** - Esquema representativo do delineamento experimental .....36
- Figura 2** - Maturação nuclear em oócitos bovinos cultivados com inibidores da meiose e antioxidantes durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por até mais 18 horas adicionais, em meio livre de inibidor.....37
- Figura 3** - Concentração intracelular de espécies reativas de oxigênio em oócitos submetidos ao transporte simulado em meio suplementado na presença ou ausência de bloqueadores da meiose e antioxidantes.....40
- Figura 4** - Concentração intracelular de espécies reativas de oxigênio em oócitos submetidos ao transporte simulado em meio suplementado na presença ou ausência de bloqueadores da meiose e antioxidantes .....42
- Figura 5** - Potencial de membrana mitocondrial de oócitos submetidos ao transporte simulado em meio suplementado com diferentes bloqueadores da meiose e antioxidantes.....44
- Figura 6** - Distribuição citoplasmática das mitocôndrias em oócitos submetidos ao transporte simulado em meio suplementado com diferentes bloqueadores da meiose e antioxidantes.....45

**Figura 7-** Clivagem e desenvolvimento de embriões produzidos a partir de oócitos bovinos submetidos ao transporte simulado em meio na presença de bloqueadores da meiose e antioxidantes .....48

### **CAPÍTULO 3 – TRANSPORTE DE OÓCITOS BOVINOS EM MEIO SUPLEMENTADO COM DIFERENTES FONTES DE MACROMOLÉCULAS E ANTIOXIDANTES: EFEITOS SOBRE A MATURAÇÃO NUCLEAR E CITOPLASMÁTICA E SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO *IN VITRO***

**Figura 1** - Esquema representativo do delineamento experimental .....75

**Figura 2** - Maturação nuclear em oócitos bovinos cultivados com inibidores da meiose e antioxidantes durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por até mais 18 horas adicionais, em meio livre de inibidor.....77

**Figura 3** - Concentração intracelular de espécies reativas de oxigênio em oócitos submetidos ao transporte simulado em meio suplementado com diferentes macromoléculas e na presença ou ausência de antioxidantes.....80

**Figura 4** - Potencial de membrana mitocondrial em oócitos submetidos ao transporte simulado em meio suplementado com diferentes macromoléculas e na presença ou ausência de antioxidantes .....83

**Figura 5** - Potencial de membrana mitocondrial ao final do cultivo de maturação de oócitos previamente submetidos ao transporte simulado em meio suplementado com diferentes macromoléculas e na presença ou ausência de antioxidantes.....84

**Figura 6** - Distribuição citoplasmática das mitocôndrias em oócitos submetidos ao transporte simulado em meio suplementado com diferentes bloqueadores da meiose e antioxidantes.....86

**Figura 7-** Clivagem e desenvolvimento de embriões produzidos a partir de oócitos bovinos submetidos ao transporte simulado em meio com diferentes bloqueadores e antioxidantes .....89

## LISTA DE ABREVIATURAS

**A** – ausente

**AI** – anáfase I

**AMPc** – monofosfato de adenosina cíclica

**ANOVA** – análise de variância

**ATP** – adenosina trifosfato

**BL** – butirolactona-I

**BSA** – albumina sérica bovina

**CDK** – ciclina dependente de cinases

**CL** – cilostamida

**CO<sub>2</sub>** – gás carbônico

**DC** – descontínua

**DF** – difusa

**EPM** – erro padrão da média

**FF** – fluido folicular

**FIV** – fertilização *in vitro*

**FSH** – hormônio folículo estimulante

**GSH** – glutationa

**GVBD** – quebra da vesícula germinativa

**H<sub>2</sub>DCFDA** - 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína

**hCG** – gonadotrofina coriônica equina

**hpi** – horas pós-inseminação

**IBMX** – 3-isobutil-1-metilxantina

**LH** – hormônio luteinizante

**nm** - nanômetros

**MAPK** – proteína cinase ativada por mitógenos

**MI** – metáfase I

**MII** – metáfase II

**MIV** – maturação *in vitro*

**MPF** – fator promotor de maturação

**MR** – milrinona

**N** – normal

**OPU** – *ovum pick up*

**PDE** – fosfodiesterases

**PHE** – penicilamina, hipotaurina e epinefrina

**PIV** – produção *in vitro* de embriões

**PKA** – proteína cinase A

**ROS** – espécies reativas do oxigênio

**SFB** – soro fetal bovino

**SOF** – *synthetic oviduct fluid*

**SPOM** – *simulated physiological oocyte maturation*

**TALP-FIV** – meio de fecundação

**T I** – telófase I

**TUNEL** - *In situ* terminal deoxinucleotidyl transferase mediated dUTP Nick end labeling assay

**VG** – vesícula germinativa

**μM** - micromolar

## SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE TRANSPORTE COM ANTIOXIDANTES E MODULADORES DE AMP CÍCLICO COMO ESTRATÉGIA PARA MELHORAR A QUALIDADE DE OÓCITOS BOVINOS DESTINADOS À PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

**RESUMO** – O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da suplementação do meio com diferentes fontes de macromoléculas, com bloqueadores da meiose e com antioxidantes durante o transporte de oócitos bovinos por 6 horas sobre: 1) progressão da maturação nuclear; 2) maturação citoplasmática e 3) competência no desenvolvimento e criotolerância dos embriões produzidos. Para tanto, o meio de transporte de oócitos foi suplementado com bloqueadores da meiose (forskolina e IBMX; Experimento 1) ou com diferentes tipos de macromoléculas (SFB ou BSA; Experimento 2), sendo que estes tratamentos ainda receberam ou não a suplementação com antioxidantes (mistura de cisteína, cisteamina e catalase). Os oócitos foram incubados em incubadora portátil (Minitub®) para simulação de transporte. Posteriormente, foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV) em incubadora a 5% de CO<sub>2</sub> em ar até completar 24h e, em seguida, foram fecundados e os prováveis zigotos foram cultivados *in vitro* durante 7 dias. Foi feito um grupo controle adicional no experimento I: MIV em incubadora com 10% de SFB por 24h. No experimento II foram feitos dois grupos controle adicionais MIV em incubadora com 10% de SFB por 24h sem e com antioxidantes (cisteína, cisteamina e catalase). Nos experimentos 1 e 2 foi avaliada a cinética da maturação nuclear e a maturação citoplasmática (através do posicionamento de mitocôndrias, do potencial de membrana mitocondrial e do conteúdo intracelular de espécies reativas do oxigênio) após o transporte e após a MIV. Avaliou-se a taxa de clivagem (48 hpi) e de desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos (168 hpi) e re-expansão após 24 horas de re-cultivo. No experimento 1, a taxa de oócitos em GV foi maior nos oócitos ( $P<0,05$ ) do grupo Transporte com bloqueador (37,9%) e menor no grupo Transporte sem bloqueador (10,1%), ambos estes grupos difeririam do grupo Controle (20,0%). Enquanto a taxa de GVBD foi maior ( $P<0,05$ ) no grupo Transporte sem bloqueador (82,8%) e menor nos grupos Controle (77,0%) e Transporte com bloqueador (62,0%). Nos oócitos dos grupos tratados com antioxidantes, após 6h de transporte, a concentração intracelular de ROS foi maior ( $P<0,05$ ) no grupo Transporte sem antioxidantes (1,5) e menor nos grupos Controle (1,0) e Transporte com antioxidantes (1,1). Com relação ao tratamento com bloqueadores, a contração de ROS foi maior ( $P<0,05$ ) nos oócitos do grupo Transporte sem bloqueador (1,5) e menor nos grupos Controle (1,0) e Transporte com bloqueador (1,2). Após 24 horas de MIV houve interação entre os tratamentos (bloqueadores+antioxidantes), sendo que os oócitos dos grupos Transporte Pré-MIV com antioxidantes (1,0) e Controle (1,0) apresentaram a maior concentração de ROS ( $P<0,05$ ), enquanto que os grupos Transporte controle (0,6) e Transporte Pré-MIV sem antioxidantes (0,5) exibiram as menores concentrações de ROS. Com relação ao potencial de membrana de mitocondrial (PMM), houve interação entre os tratamentos quando os oócitos foram avaliados após 6 e 24 horas. Após 6 horas Transporte Pré-MIV sem antioxidantes (1,00) e Controle (0,9±0,08) apresentaram o maior PMM, que diferiu ( $P<0,05$ ) dos

grupos Transporte Pré-MIV com antioxidantes (0,6) e Transporte controle (0,6). Após 24 horas, os grupos Controle (1,00) e Transporte Pré-MIV com antioxidantes (0,8) apresentaram o maior PMM, e diferiram ( $P < 0,05$ ) dos demais grupos (0,5-0,6). No experimento 2, a taxa de oócitos em GVBD foi maior ( $P < 0,05$ ) no grupo Transporte SFB (86,8%) e menor em Controle (77,0%), ambos os grupos foram semelhantes a Transporte BSA (82,8%). Nos oócitos dos grupos tratados com antioxidantes após 6 horas as concentrações de ROS foi maior ( $P < 0,05$ ) no grupo Transporte sem antioxidantes (1,6) e menor nos grupos Controle sem antioxidantes (1,0), Controle com antioxidantes (1,1) e Transporte com antioxidantes (1,2) e após a MIV foi maior no controle (1,0) diferindo ( $P < 0,05$ ) dos demais grupos (0,5-0,7). Com relação ao PMM, após 6 horas de transporte houve interação entre os tratamentos (macromoléculas+antioxidantes), o grupo Controle (1,0) apresentou maior ( $P < 0,05$ ) PMM, e nos grupos Controle com antioxidantes (0,6), Transporte SFB com antioxidantes (0,6) e Transporte BSA (0,6) foi observado menor PMM. Após 24 horas não foi verificada interação entre os tratamentos, nos oócitos tratados com antioxidantes, o grupo Controle (1,0) mostrou maior ( $P < 0,05$ ) PMM, os grupos Transporte sem antioxidantes (0,4) e Transporte com antioxidantes (0,5) apresentaram menor PMM. A adição de bloqueadores da meiose (IBMX associado à forskolina) ao meio de transporte de oócitos bovinos permite um transporte adequado por 6h, preservando a qualidade e integridade dos oócitos e permitindo uma produção embrionária semelhante à obtida *in vitro* a partir de oócitos que não foram submetidos ao transporte.

**Palavras-chave:** bloqueadores da meiose, maturação *in vitro*, antioxidantes, macromoléculas, transporte de oócitos.

## **SUPPLEMENTATION OF TRANSPORT MEDIUM WITH ANTIOXIDANTS AND MODULATORS OF cAMP AS A STRATEGY TO IMPROVE THE QUALITY OF CATTLE OOCYTES INTENDED FOR PRODUCTION IN VITRO EMBRYOS**

**Abstract** - The objective of this study was to evaluate the effects of supplementation of the medium with different sources of macromolecules with blockers of meiosis and antioxidants during transport of bovine oocytes for 6 hours on: 1) progression of nuclear maturation; 2) cytoplasmic maturation and 3) competence in the development and cryotolerance of embryos produced. Therefore, the medium of transport oocytes was supplemented with blocking of meiosis (forskolin and IBMX; Experiment 1) or with different types of macromolecules (FCS or BSA; Experiment 2), and these treatments yet received or not antioxidant supplementation (mixture of cysteine, cysteamine and catalase). Oocytes were incubated in a portable incubator (Minitub®) for transport simulation. Posteriorly were submitted in vitro maturation (IVM) in incubator at 5% CO<sub>2</sub> in air until to complete 24 hours and then were fertilized and presumptive zygotes were cultured in vitro for 7 days. Has been made an additional control group in the experiment I: MIV incubator with 10% FCS for 24 hours (Control). In the second experiment were performed two additional control groups: IVM incubator with 10% FCS for 24 hours (Control); and IVM in an incubator with 10% FCS and antioxidants (cysteine, cysteamine and catalase) for 24 hours (Contr+Atx). In Experiments 1 and 2 were evaluated after nuclear maturation kinetics and cytoplasmic maturation (made by positioning mitochondria, the mitochondrial membrane potential and intracellular content of reactive oxygen species) of transport and after IVM. We evaluated the cleavage (48 hpi), embryo development to the blastocyst stage (168 hpi), and the re-expansion rate after 24 hours of re-cultivation. In experiment 1, the GVBD rate was higher ( $P < 0.05$ ) in Transport group (82.8%) and lower in control group (77.0%) and Transport with blocker (62.0%). In oocytes treated groups antioxidants, after 6 hours of transport, the intracellular concentration of ROS was higher ( $P < 0.05$ ) in Transport group (1.5) and lower in group Control (1.0) and Transport with Antioxidants (1.1). Regarding the treatment with blockers, ROS contraction was higher ( $P < 0.05$ ) in the oocytes Transport group (1.5) and lower in groups Ccontrol (1.0) and Transport with Blocker (1.2). After 24 hours of IVM interaction was observed between treatments (blockers+antioxidants), and the groups of oocytes Transport Pre-IVM + Atx(1.0) and Control (1.0) had the highest concentration of ROS ( $P < 0.05$ ), while Transport Control (0.6) and Transport Pre-IVM (0.5) groups exhibited the lowest concentrations of ROS. Regarding the mitochondrial membrane potential (MMP), there was an interaction between treatments when the oocytes were evaluated after 6 and 24 hours. After 6 hours Transport Pre-IVM (1.00) and Control (0.9 ± 0.08) had the highest MMP, which differed ( $P < 0.05$ ) Transport Pre-IVM + Atx (0.6) and Transport Control (0.6) groups. After 24 hours, the Control (1.0) and Transport Pre-IVM + Atx (0.8) groups had the



highest MMP and differ ( $P < 0.05$ ) from the others groups (0.5 to 0.6). In experiment 2, the GVBD oocyte rate was higher ( $P < 0.05$ ) in the Transport FCS group (86.8%) and lowest in Control FCS (77.0%), both groups were similar Transport BSA (82.8%). With respect to the concentration of ROS in the groups supplemented with macromolecules, after 6 hours was higher ( $P < 0.05$ ) in the TB group (1.5) and TS (1.3) and lower in CS (1.0). In oocytes groups treated with antioxidants after 6 hours ROS concentration was higher ( $P < 0.05$ ) in Transport group (1.6) and lower in Control (1.0), Control with Antioxidants (1.1) and Transport with Antioxidants (1.2) groups and after IVM was higher in Control (1.0) differ ( $P < 0.05$ ) from the other groups (0.5 to 0.7). Regarding PMM, after 6 hours of transport was no interaction between treatments (macromolecules+antioxidants), Control (1.0) group had higher ( $P < 0.05$ ) MMP, and Transport BSA (0.6) was observed less MMP. After 24 hours was not verified interaction between treatments, in oocytes treated with antioxidants, the Control (1.0) group demonstrate higher ( $P < 0.05$ ) MMP, Transport (0.4) and Transport with Antioxidants (0.5) groups had a lower MMP. The addition of blocking meiosis (IBMX associated with forskolin) in oocytes transport medium permits adequate transport for 6h, preserving the quality and integrity of the oocyte and allowing embryo production similar to that obtained *in vitro* from oocytes that were not subjected to transport.

**Keywords:** blocking meiosis, *in vitro* maturation, antioxidants, macromolecules, oocyte transport.

## CAPITULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### INTRODUÇÃO

As biotecnologias da reprodução assistida vêm sendo empregadas em larga escala, tanto na reprodução humana quanto na reprodução animal, principalmente em bovinos. Destaca-se especialmente a produção *in vitro* (PIV) de embriões, que consiste na obtenção dos oócitos, maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) de embriões. Através da PIV é possível diminuir o intervalo entre as gerações e promover o melhoramento genético do rebanho, mas a técnica também proporciona outras vantagens, tais como a obtenção de embriões de fêmeas inférteis ou prenhas (MERTON et al., 2013).

Para finalidades de pesquisa, os oócitos são geralmente obtidos a partir de ovários de abatedouro, mas a aplicação comercial exige a obtenção dos oócitos através da aspiração folicular guiada por ultra-sonografia (“ovum pick-up” - OPU) em fêmeas vivas. A OPU associada à PIV tem sido empregada em programas comerciais de reprodução bovina, pois através desta associação é possível aumentar o número de embriões de doadoras de elevado potencial genético (GUEMRA et al., 2014).

Entretanto, a eficiência da PIV de embriões é considerada baixa quando comparada com a produção *in vivo*. Isto porque a aquisição da competência do oócito para retomar a meiose e, posteriormente, para se desenvolver em um embrião normal é gradual e ocorre ao longo da oogênese, sob controle e com suporte das células foliculares. Quando os oócitos são retirados do ambiente folicular, retomam a meiose espontaneamente sem estarem plenamente capacitados, não sendo capazes de suportar a FIV e ter um desenvolvimento embrionário normal (YANG et al., 1998). Devido a isso, a maturação *in vitro* é considerada como um passo primordial e decisivo, pois a qualidade dos oócitos e o meio de cultivo interferem diretamente na aquisição da competência oocitária e no futuro desenvolvimento do embrião (DEMYDA-PEYRÁS et al., 2013).

O bloqueio temporário da retomada da meiose tem sido utilizado como estratégia para que os oócitos tenham oportunidade de passar pelas as modificações necessárias para aquisição da competência. Esse tempo adicional, denominado cultivo de pré-maturação, pode propiciar uma oportunidade para que haja melhor sincronização entre maturação nuclear e citoplasmática, melhorando a capacitação do oócito (ADONA et al., 2008; FERREIRA et al., 2009). Diversos tipos de inibidores da meiose já foram utilizados com sucesso. A forskolina e o 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), por exemplo, são moduladores do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e, ao elevar os níveis de AMPc intraocitário, mantêm o bloqueio meiótico (EZOE et al., 2015).

Outra estratégia utilizada para otimizar as condições do cultivo de PIV é a adição de antioxidantes ao meio de maturação. Quando os oócitos são aspirados do folículo ovariano, perdem a defesa natural dos antioxidantes presentes no ambiente folicular. Desta forma, se tornam mais suscetíveis às ações prejudiciais de elevadas concentrações de espécies reativas de oxigênio (ROS) que são geradas em decorrência de vários fatores exógenos inerentes aos sistemas de cultivo, tais como exposição à luz, elevadas concentrações de oxigênio ou até mesmo certas substâncias presentes nos meios de cultivo (GUÉRIN et al., 2001). O desequilíbrio entre a capacidade antioxidante do oócito/embrião e o excesso de ROS pode levar à condição de estresse oxidativo, que pode acarretar em diferentes tipos de injúrias celulares, tais como peroxidação lipídica, oxidação de aminoácidos e ácidos nucléicos, bem como apoptose (FEUGANG et al., 2003).

Assim, a adição de antioxidantes ao meio MIV poderia ser benéfica. A glutathione (GSH) é a principal proteção do oócito contra os efeitos das ROS, pois atua na manutenção do estado redução-oxidação (redox) das células, protegendo-as contra os danos oxidativos (DELEUZE & GOUDET, 2010) ao promover a detoxificação de peróxidos lipídicos e de proteínas tioladas, bem como a remoção das ROS, especialmente o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (JOHNSON & NARSESFAHANI, 1994). Portanto, o aumento da síntese de GSH durante a maturação pode ser correlacionado com a competência do oócito para o posterior desenvolvimento embrionário inicial e viabilidade pós-criopreservação (FURNUS et al., 2008). A cisteína e a cistemina são moléculas precursoras de GSH e, quando

presentes no meio de cultivo, aumentam a sua síntese e, portanto, proporcionam maior proteção à célula. Visando maior proteção contra as ROS, pode-se associar também a catalase aos antioxidantes intracelulares cisteína e cisteamina, visto que é um antioxidante enzimático extracelular e poderá proteger os oócitos das ROS presentes nos meios de cultivo, favorecendo o sistema de produção *in vitro* de embriões.

Devido à distância entre o laboratório e local de coleta dos oócitos, o transporte pode durar muitas horas e com isso diminuir a viabilidade dos mesmos, representando um desafio para a PIV comercial. O transporte dos oócitos em meio suplementado com bloqueadores da meiose (sistema de pré-maturação) e antioxidantes pode ser uma alternativa para melhorar a viabilidade e qualidade dos oócitos bovinos. Assim sendo, o presente estudo propõe a avaliação dos efeitos de um sistema pré-maturação que consiste da suplementação do meio de transporte com moduladores de AMP cíclico (forcolina e IBMX), com diferentes macromoléculas (SFB e BSA) e com adição de antioxidantes (cisteína, cisteamina e catalase) sobre as taxas de maturação nuclear, avaliação do potencial de membrana mitocondrial, distribuição citoplasmática de mitocôndrias, produção de espécies reativas de oxigênio, desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto e criotolerância destes. Visando a melhora a qualidade dos oócitos e o subsequente desenvolvimento embrionário, assim como diminuir a concentração intracelular das ROS.

## REVISÃO DE LITERATURA

### Transporte de Oócitos

Apesar dos avanços obtidos na produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos e o estabelecimento de sua utilização na rotina comercial, há mais de 10 anos os índices tem se mantido estáveis, ou seja, a taxa de maturação nuclear e de fecundação são em torno de 80% e a de produção de blastocistos em torno de 35-40% (PONTES et al., 2011). As taxas de blastocistos maturados *in vivo* são superiores às encontradas *in vitro*, por isso acredita-se que a maturação *in vitro* ainda seja um dos passos limitantes para o incremento na eficiência da PIV. No cenário comercial da PIVE, o grande desafio é o transporte de oócitos do local de coleta até o laboratório, o que pode demorar horas e, com isso, diminuir a viabilidade e qualidade dos COC aspirados (NEVES et al., 2010; PHONGNIMITR et al., 2013).

As condições de transporte dos oócitos são consideradas um fator limitante da produção comercial, pois a temperatura, o pH do meio e a duração do transporte vão influenciar na competência oocitária e em sua capacidade de produzir embriões viáveis (MIRANDA et al., 2007; SILVA et al., 2011).

Os métodos de transporte dos complexos *cumulus*-oócitos (COCs) variam; por exemplo, podem ser acondicionados em tubos de poliestireno ou em criotubos que são mantidos em recipientes com diferentes fontes de aquecimento e sem controle da atmosfera gasosa, ou em incubadoras portáteis com controle da atmosfera gasosa e temperatura. Um dos principais fatores que interferem na PIVE é o meio utilizado durante o transporte-maturação de oócitos bovinos, que pode ser constituído de TCM-199 (sais de Earle) acrescido de bicarbonato e HEPES (tampões), com ou sem adição de hormônios (GARCIA et al., 1998; SILVA et al., 2011). Quando não se tem controle da atmosfera gasosa durante o transporte é necessária a adição de um tampão orgânico para minimizar as variações de pH. Outro fator essencial é o controle eficiente da temperatura (idealmente a 38,5°C) durante o transporte, que simula as condições encontradas *in vivo* e *in vitro* (LOIOLA et al., 2014).

O fluido folicular (FF) bovino é uma alternativa para manutenção dos COCs durante o transporte. O FF obtido de folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm pode ser utilizado para manutenção de oócitos bovinos antes do início da MIV por períodos curtos (LEHMKUHL et al., 2000). Os oócitos mantidos em FF sofrem um bloqueio do ciclo meiótico, possibilitando maior sincronia entre maturação citoplasmática e nuclear. Todavia, existe grande variação conforme a réplica do FF, além do risco de se introduzir agentes infecciosos por ser um produto de origem biológica (LEIVAS et al., 2004).

### **Antioxidantes**

O transporte de oócitos e a PIVE podem afetar a estrutura e o metabolismo celular devido à produção excessiva de ROS, comprometendo a sobrevivência celular. *In vivo*, os oócitos e embriões estão protegidos por antioxidantes presentes nos folículos e em fluidos do oviduto, porém *in vitro* perdem essa defesa natural (UFER et al., 2010).

Diversos fatores exógenos e endógenos podem elevar a produção de ROS. Entre os principais fatores exógenos estão a elevada tensão de oxigênio, o excesso de glucose, íons metálicos, luz, espermatozoides e o processo de criopreservação de oócitos e embriões. O principal fator endógeno que influencia na produção de ROS é a fosforilação oxidativa, via metabólica que gera grande parte da energia produzida no organismo.

A fosforilação oxidativa, que ocorre na mitocôndria, implica em cinco complexos enzimáticos chamados de cadeia respiratória (ou cadeia transportadora de elétrons). Os complexos de I a IV estão envolvidos no transporte de elétrons através de uma série de proteínas via reações redox (reduções oxidativas), tendo como destino final uma molécula de oxigênio. Em condições de normalidade, o oxigênio é convertido em água no complexo IV e a energia é estocada e usada para a produção de ATP no complexo V. Entretanto, durante esse processo pode haver perda de elétrons entre os complexos e estes elétrons podem se ligar ao oxigênio

(que é consumido pela mitocôndria no complexo IV para formar água) produzindo, então, ROS (BARJA, 2007).

Em condições de normalidade há um equilíbrio entre a produção de ROS e os agentes antioxidantes intracelulares; entretanto, a produção excessiva de ROS e/ou a queda nas reservas endógenas de antioxidantes leva a um desequilíbrio denominado estresse oxidativo. O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxila (HO) e o radical peróxido ( $ROO\cdot$ ) são as ROS comumente envolvidas nos processos de atividade ovariana e gametogênese, incluindo a maturação oocitária (ROCHA-FRIGONI et al., 2014). A elevação nos níveis de ROS promove diversas alterações, como peroxidação lipídica, fragmentação do DNA, oxidação de diversas moléculas e morte celular (AGARWAL et al., 2003). A membrana é um dos componentes celulares mais atingidos em decorrência da oxidação dos ácidos graxos ou peroxidação lipídica, gerando alterações na sua estrutura e permeabilidade (GUÉRIN et al., 2001). Como estratégia para diminuir a concentração intraoocitária de ROS durante PIV, tem-se testado a adição de agentes antioxidantes aos meios de cultivo, com a finalidade de minimizar possíveis danos provocados pelo excesso da produção de ROS.

Os antioxidantes são moléculas capazes de converter as ROS em água e oxigênio, prevenindo o aumento de suas concentrações no meio ou dentro da célula. Em baixas concentrações, os antioxidantes retardam ou inibem a oxidação de um determinado substrato oxidável de maneira eficaz, podendo atuar por meio do sistema enzimático ou não enzimático. Os antioxidantes enzimáticos (ou naturais) são compostos pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), peroxirredoxinas e catalase (CAT). O sistema não enzimático inclui compostos hidrofílicos e lipofílicos, como vitamina C (ácido ascórbico) e vitamina E (alfa-tocoferol), glutathiona, glutathiona redutase (GSH redutase), glutathiona peroxidase (GSH peroxidase), diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico e ácido lipóico (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

A cisteína e a cisteamina são moléculas precursoras da GSH, esta é considerada como principal componente sulfidril não proteico presente nas células e exerce função de proteção contra os efeitos destrutivos das ROS. O nível de GSH

aumenta durante a MIV e, *in vivo*, tem seu pico próximo à ovulação. Sua síntese está relacionada com a disponibilidade de cisteína no meio extracelular, entretanto a cisteína é um aminoácido muito instável fora da célula e é auto-oxidada em cistina. A cisteamina, componente tiol de baixo peso molecular, reduz a cistina em cisteína, disponibilizando sua captação pelas células e estimulando a síntese intracelular de GSH (HOCHI et al., 1991; MERTON et al., 2013).

A catalase é um antioxidante enzimático que atua na remoção do peróxido de hidrogênio extra-celular ao catalisar a conversão do peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular e duas moléculas de água. De acordo com Orsi e Leese (2001), a adição de catalase ao meio de cultivo foi benéfica, uma vez que melhorou o desenvolvimento embrionário (ORSI E LEESE 2001).

Deste modo, a adição de cisteína, cisteamina e catalase ao meio de transporte pode proporcionar proteção contra os danos oxidativos ao oócito durante o cultivo de pré-maturação, favorecendo o subsequente desenvolvimento embrionário.

Pode-se mensurar as espécies reativas de oxigênio com auxílio da sonda 2'-7' diclorodihidrofluoresceína diacetato, forma quimicamente reduzida. Esta é permeável à membrana celular e não fluorescente. Na presença de ROS, este composto é oxidado no interior da célula e produz um composto verde fluorescente, 2', 7'- diclorofluoresceína, que permanece intracelular (SRIVASTAVA et al., 2009). Também foi demonstrado que a oxidação do 2'-7' diclorodihidrofluoresceína diacetato é quantitativamente proporcional à concentração de peróxido de hidrogênio gerado (HIRABAYASHI et al., 1985).

### **Maturação de oócitos**

O processo de diferenciação do oócito é longo e tem seu início durante a vida fetal. Durante o desenvolvimento folicular o oócito adquire competência para posteriormente retomar a meiose e realizar com êxito a maturação nuclear e citoplasmática (LONERGAN et al., 2003; BARRETTO et al., 2007).



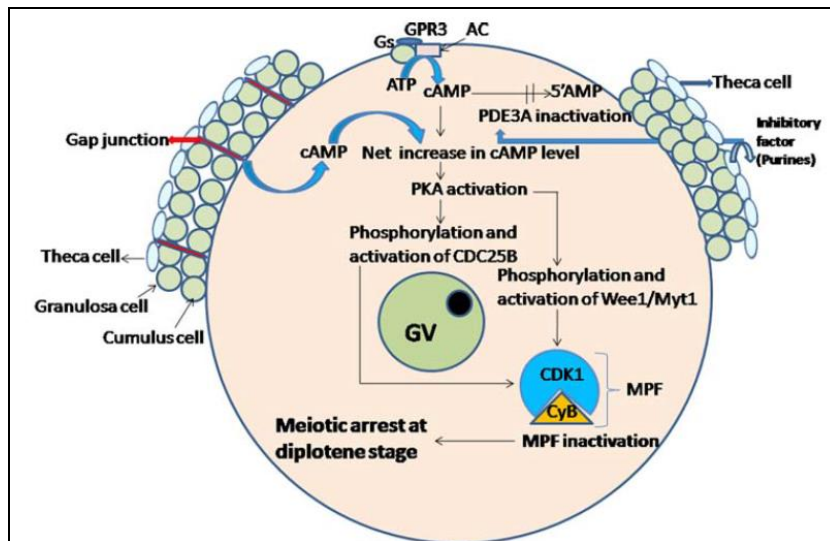
## Maturação Nuclear

Desde a formação e crescimento dos oócitos e dos folículos, até após o período de dominância folicular, a meiose dos oócitos permanece bloqueada no estágio de diplóteno da prófase da primeira meiose (primeiro bloqueio da meiose). O reinício da meiose, *in vivo*, ocorre estimulado pelo pico pré-ovulatório de LH, quando os oócitos se apresentam competentes (competência meiótica). A retomada da meiose é caracterizada pela quebra da vesícula germinativa e progressão até metáfase II, quando ocorre novo bloqueio até a fertilização. Esta progressão do desenvolvimento do oócito em resposta ao pico de LH é denominada maturação oocitária e é marcada por uma série de transformações bioquímicas e estruturais no citoplasma e no núcleo do oócito, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (MACHATKOVA et al., 2004; DE SOUSA et al., 2004).

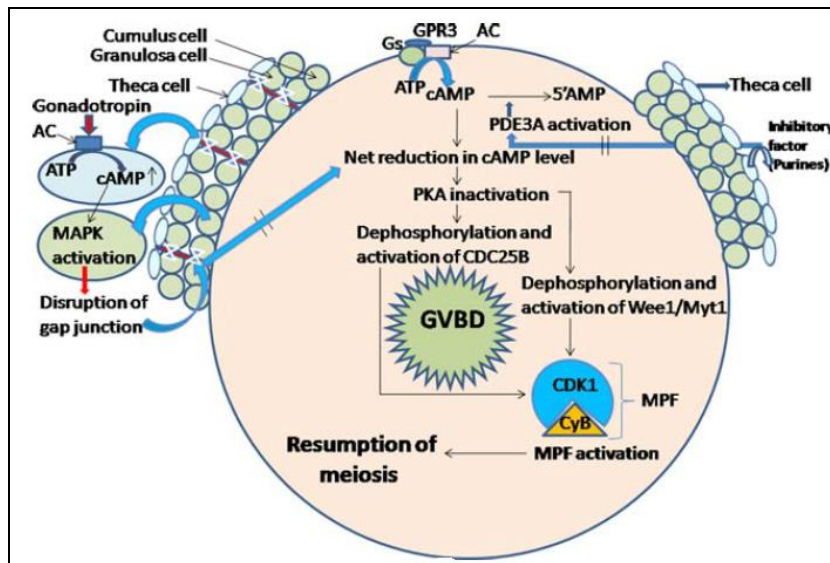
O monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) desempenha importante papel na manutenção do bloqueio da meiose no estágio de diplóteno. Esta molécula sinalizadora é sintetizada no oócito e nas células *cumulus*, das quais migram para o oócito via junções GAP. O nível de AMPc intraoocitário é essencial para manutenção do bloqueio meiótico, assim como o nível do monofosfato de guanossina cíclico (GMPc) que inibe a fosfodiesterase 3A (PDE3A), a enzima que impede a degradação do AMPc. O GMPc é sintetizado pelas células do *cumulus* e migra para o oócito pelas junções GAP; esta molécula de sinalização atua na manutenção dos níveis de AMPc, impedindo a progressão meiótica (TRIPATHI et al., 2010)

Os níveis moderados de AMPc estimulam a atividade da proteína quinase A (PKA), a qual fosforila a subunidade catalítica (CDK1) do fator promotor da maturação (MPF), inativando-o e, assim, mantêm o bloqueio meiótico conforme mostra a Figura 1. *In vivo*, com o pico de LH, há um aumento inicial significativo da concentração intraoocitária de AMPc, induzindo a PKA a produzir EGF (*Epidermal Growth Factor*). O EGF atua estimulando a atividade da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) nas células do *cumulus*, mas não no oócito, gerando interrupção na comunicação entre *cumulus* e oócito através da fosforilação da proteína conexina 43 presente nas junções GAP. Desta forma, ocorre diminuição dos níveis de AMPc e GMPc intraoocitário, ativação da PDE3A, defosforilação da CDK1 e ativação do

MPF, com consequente quebra da vesícula germinativa (Figura 2), caracterizando a retomada da meiose (ZENG et al., 2014).



**Figura 1.** Modelo proposto de manutenção do bloqueio meiótico no oócito em estágio de diplóteno (Prófase I) no folículo pré-ovulatório (fonte: TRIPATHI et al., 2010)



**Figura 2.** Modelo proposto de retomada da meiose induzida pelo LH (fonte: TRIPATHI et al., 2010).

### Maturação citoplasmática

A maturação nuclear e citoplasmática são eventos interligados que ocorrem em sincronia. A maturação citoplasmática envolve a redistribuição de organelas e

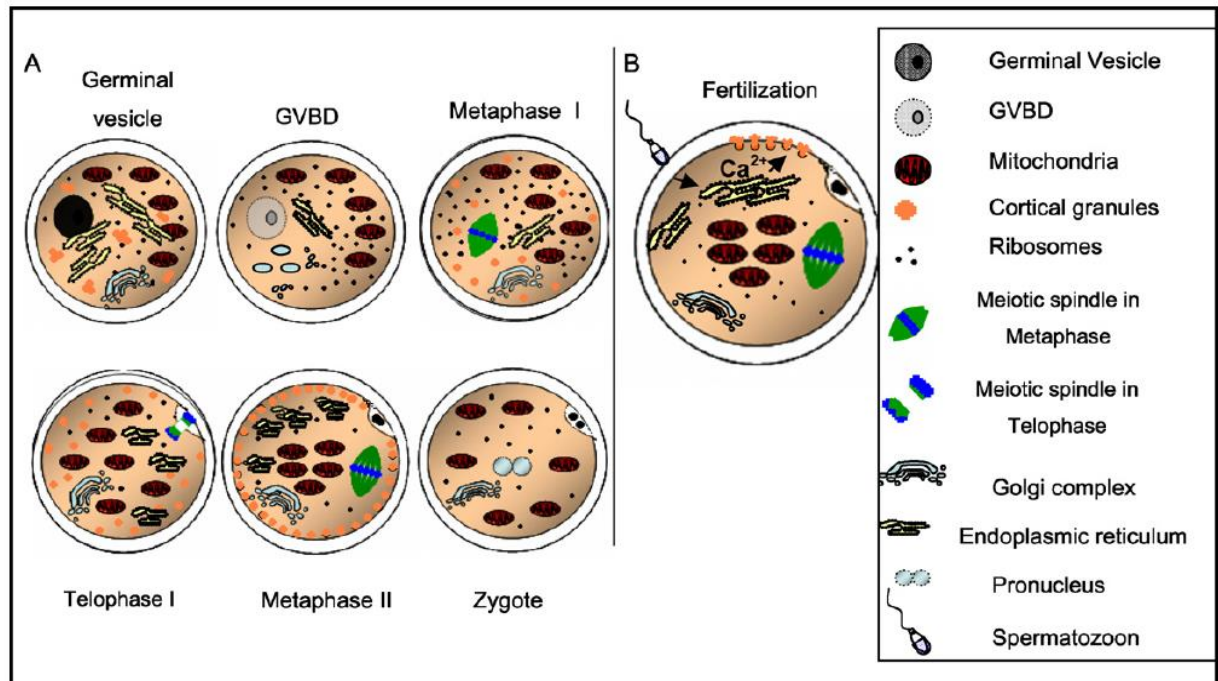
dinâmica dos filamentos do citoesqueleto, além da transcrição, armazenamento e processamento de RNAm expressos pelos cromossomos (FERREIRA et al., 2009).

A migração das organelas ocorre via citoesqueleto, pelos microfilamentos e microtubulos, e o seu reposicionamento irá depender das necessidades da célula como mostra a Figura 3. O reticulo endoplasmático se apresenta uniformemente distribuído e os grânulos corticais dispersos em forma de *clusters* durante a profáse I. Quando há retomada da meiose, com progresso até a fase de MII, ocorre a movimentação dos grânulos corticais para a periferia do oócitos e então, na fertilização do oócito, há grande liberação de cálcio pelo retículo endoplasmático com subsequente exocitose dos grânulos corticais (ALBERTINI et al., 1992; FERREIRA et al., 2009).

A mitocôndria fornece o aporte energético necessário à célula durante a maturação, por isso existe a necessidade de sua redistribuição para os locais que demandam mais energia. Durante o estadio de Profáse I (oócito imaturo em vesícula germinativa), as mitocôndrias se localizam na periferia do oócito, enquanto que no estágio de Metáfase II (MII; oócito maturado) estão dispersas no centro da célula, próximas ao fuso meiótico (STOJKOVIC et al., 2001).

Alguns marcadores fluorescentes conseguem avaliar o potencial da membrana mitocondrial, que está relacionado à capacidade da mitocôndria em bombear prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, por meio da energia livre gerada pelo transporte de elétrons (CHEN, 1988). O mecanismo de incorporação das sondas fluorescentes ocorre quando esta se difunde livremente pela membrana plasmática até o citosol da célula e se acumula eletroforicamente na matriz da mitocôndria metabolicamente ativa, guiada por força motriz de próton gerado por transferência de cadeia de elétron localizada na membrana mitocondrial interna (CELEGHINI et al., 2007). Para avaliação da atividade mitocondrial destacam-se as sondas fluorescentes H2-CMXros e CMXros, conhecidas comercialmente como Mito Tracker Red®. De acordo com Celeghini et al. (2007) o CMXros só emite fluorescência em mitocôndrias com alta atividade mitocondrial, não havendo fluorescência em mitocôndrias com baixa ou média atividade, o que

revelava a desvantagem desta sonda, por não permitir a classificação da atividade mitocondrial.



**Figura 3.** Esquema da distribuição das organelas citoplasmáticas durante a maturação, fertilização e formação do zigoto bovino (fonte: FERREIRA et al., 2009).

### Suplementação proteica durante a MIV

A PIVE é influenciada por diversos fatores, incluindo o suplemento de macromoléculas nos meios de cultivo. Foi demonstrado que o tipo de proteína utilizada no meio de maturação de oócitos pode influenciar o futuro desenvolvimento embrionário (SHIRAZI et al., 2012).

As fontes proteicas mais utilizadas nos meios de cultivo *in vitro* são a albina bovina séria (BSA) e o soro fetal bovino (SFB) (DE MATOS et al., 2002; RIZOS et al., 2002; SOUZA-FABJAN et al., 2013). Esses componentes são partículas coloides que suplementam o meio com fatores de crescimento, hormônios, aminoácidos e proteínas que são benéficas ao desenvolvimento do embrião (WEBSTER 1982; ZUELKE and BRACKETT 1990). O Soro e o BSA, quando utilizados no meio

maturação (MIV), podem agir na manutenção do pH, quelar metais pesados, fornecer proteção contra ROS e estimular o crescimento (RIZOS et al., 2002).

A utilização de TCM-199 e SFB durante a MIV pode elevar significativamente a maturação oocitária e o subsequente desenvolvimento embrionário. Sua utilização é efetiva na retomada da meiose e na maturação citoplasmática, além das taxas de clivagem e blastocistos serem superiores quando os oócitos são maturados em meio de MIV suplementado com SFB, quando comparado à utilização de BSA (DOWNS et al. 2009; DEL COLLADO et al., 2015).

Entretanto, o SFB possui elevadas concentrações de ácidos graxos, o que acarreta em grande acúmulo lipídico intraoocitário. O aumento de lipídeos gera maior  $\beta$ -oxidação na mitocôndria, via metabólica que fornece suporte energético necessário à célula. A  $\beta$ -oxidação gera amônia como substrato lipídico, o que pode culminar em danos na membrana mitocondrial (quando em grande quantidade) (RUSSEL et al., 2006). O excessivo acúmulo de lipídeos durante a PIV também está associado à baixa criotolerância dos embriões produzidos. Os embriões bovinos produzidos mediante a utilização de soro nos meios de cultivo apresentam maiores taxas de apoptose e maior massa celular interna, o que também contribui para redução da criotolerância das estruturas em questão (RIZOS et al., 2002; DUNNING et al., 2010).

Em substituição ao soro, frequentemente utiliza-se o BSA como fonte proteica em meios de cultivo de oócitos e embriões. O BSA, diferentemente do SFB, não ocasiona elevação lipídica tão pronunciada e não é prejudicial a membrana mitocondrial. Assim como não diminui a criotolerância dos embriões produzidos *in vitro*. Porém, foi relatado que pode diminuir a maturação nuclear (atraso na retomada da meiose) quando os oócitos são cultivados com BSA durante a MIV (DUNNING et al., 2010). A inadequada maturação nuclear pode ser decorrente da falta de L-carnitina na composição do meio com BSA, pois esta é responsável pelo transporte dos ácidos graxos para dentro da membrana mitocondrial para que ocorra a  $\beta$ -oxidação, assim fornecendo aporte energético para a retomada da meiose (DOWNS et al. 2009; DUNNING et al. 2010).

Uma vez que as macromoléculas de origem animal (SFB e BSA) sofrem variações na sua composição e risco de transmissão de patógenos, como encefalopatia espongiforme bovina e vírus (ABE et al., 1999; RATY et al., 2011), moléculas sintéticas podem ser utilizadas em sua substituição, tais como o polivinilpirrolidona (PVP), álcool polivinílico (PVA) e Knockout (GOLDSBOROUGH et al. 1998; MINGOTI et al., 2011).

### **Pré-cultivo com inibidores da meiose**

Durante a MIV, geralmente utiliza-se oócitos provenientes de aspiração folicular, provenientes de folículos que possuam entre 3 a 8 mm de diâmetro; no entanto, estima-se que grande parte dessa população seja incompetente para o desenvolvimento. Quando oócitos são removidos do ambiente folicular, ocorre uma interrupção do estímulo que mantém o bloqueio meiótico e estes retomam a meiose espontaneamente. Observa-se então uma perda da sincronia entre maturação citoplasmática e nuclear, o que influencia negativamente a aquisição da competência oocitária (LONERGAN et al., 1994; ADONA, 2006).

Uma alternativa proposta para melhorar a sincronia entre maturação citoplasmática e nuclear é submeter os oócitos a um cultivo de pré-maturação, durante o qual o bloqueio meiótico permanece mantido (fase de vesícula germinativa), permitindo um tempo adicional para que os oócitos tenham oportunidade de chegar aos estágios finais de seu desenvolvimento (DEKEL, 2005; DUMONT et al., 2005). Como principais métodos de inibição da meiose, pode-se utilizar os inibidores fisiológicos (fluido folicular), os agentes moduladores de AMPc, os inibidores da atividade de proteínas quinases e, como método alternativo, o SPOM ("stimulated physiological oocyte maturation") (EPPIG J., 1989; ALBUZ et al., 2010).

O SPOM, proposto por Albus et al. (2010), é um sistema que simula a maturação fisiológica que ocorre em *in vivo* e apresenta resultados promissores, pois aumenta a produção de embriões. Todavia, este sistema parece ser adequado apenas no sistema idealizado pelos autores, visto que Rose et al. (2013) e Li et al.

(2016), não observaram aumento na produção e qualidade de embriões produzidos *in vitro* quando utilizaram SPOM em presença de FSHr, BSA e em baixa tensão de oxigênio. Assim, este sistema representa uma alternativa para o aumento da eficiência da MIV e da PIVE de animais, mas são necessários mais estudos para demonstração de sua eficácia.

Os inibidores farmacológicos e fisiológicos da maturação nuclear têm sido amplamente testados. Os inibidores da atividade das quinases (MPF e MAPK), como a roscovitina e butirolactona, atuam na competição por sítios de ligação de ATP, impedindo a ligação do ATP necessário para as atividades de fosforilação.

Existem ainda os inibidores que podem manter altas concentrações de AMPc no interior do oócito, como o IBMX e a forskolina (NEÁNT e GERRIER, 1988; JESSUS et al., 1991; MEIJER, 1996; SIMILI et al., 1997; DODE e ADONA, 2001; BILODEAU-GOESEELS, 2003). O IBMX é um inibidor de PDE não específico e também previne a hidrólise do GMPc. Já a forskolina é derivada de uma planta asiática (*Colleus paraphoskolia*) e é um ativador da adenilciclase, enzima que aumenta os níveis de AMPc nas células do *cumulus*. Sistemas envolvendo pré-maturação com forskolina e IBMX mostraram grande e rápido aumento nos níveis de AMPc, assim como a manutenção dos níveis de GMPc (ZENG et al., 2014). De acordo com Ezoie et al. (2015), após o tratamento com forskolina e IBMX durante a pré-maturação conseguiu-se elevar os níveis de AMPc, com consequente melhora na competência para o desenvolvimento embrionário futuro.

### **Criopreservação de embriões**

Como anteriormente relatado, a adição de bloqueadores da meiose e antioxidantes ao meio de transporte, num sistema de pré-MIV, pode ser uma estratégia interessante para melhorar a qualidade e viabilidade dos oócitos. Tal melhoria pode ser benéfica para a futura criopreservação dos embriões, uma vez que existem evidências de que as condições de maturação podem influenciar a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* (RATY et al., 2011).

O processo de criopreservação tem como princípio a utilização de temperaturas muito reduzidas, como estratégia para privação de energia e redução do metabolismo, resultando na preservação de forma eficiente da estrutura e função de células. A criopreservação exige a exposição de células à substâncias crioprotetoras antes do processo de redução de temperatura, com substituição da água presente no meio intracelular por crioprotetores, através de um gradiente osmótico. Isto resulta em desidratação e, conseqüentemente, maior proteção celular. A criopreservação de embriões bovinos tem sido empregada comercialmente em larga escala, pois permite a formação de bancos genéticos e o aproveitamento reprodutivo dos animais (PEGG, 2007; LUZ et al., 2011; GUTNISKY et al., 2013).

Os procedimentos mais utilizados para criopreservação de embriões são o congelamento lento tradicional e a vitrificação. Ambos os métodos vem sendo utilizados para criopreservação de oócitos e embriões em diversas espécies, com bons resultados. A congelação lenta utiliza baixas concentrações de agentes crioprotetores e o resfriamento é realizado de forma gradual. Por outro lado, a vitrificação consiste em resfriamento ultra-rápido (em torno de 20.000 °C/min) e a estrutura a ser criopreservada é imersa diretamente em nitrogênio líquido (sem utilização de equipamentos sofisticados). A vitrificação apresenta a desvantagem de utilizar altas concentrações de crioprotetores com conseqüente efeito tóxico, entretanto elimina totalmente as injúrias decorrentes da formação de cristais de gelo (VAJTA et al., 1998; WOWK, 2010; CHANKITISAKUL et al., 2013).

Diversos métodos de vitrificação têm sido utilizados de forma eficiente, como: "Open Pulled Straw" (OPS), Cryoloop, Cryotop, Cryoleaf, Cryotech e Vitri-ingá (VAJTA et al., 1998; ALMODIN et al., 2010; GUTNISKY et al., 2013). As técnicas de vitrificação diferem entre si por detalhes técnicos, que incluem as soluções de equilíbrio, parâmetros de diluição, métodos de resfriamento, estocagem e aquecimento. Essa variedade dificulta a escolha da melhor técnica, variando de acordo com o laboratório (VAJTA et al., 2014).

Estes métodos foram desenvolvidos de forma a utilizar o mínimo volume de solução de vitrificação. O protocolo da Vitri-ingá descrito por Almodim et al. (2010), apresentou resultados positivos, sendo considerado um método eficiente de



vitriificação para criopreservação de gametas e embriões humanos e bovinos (ALMODIN et al., 2010).

## REFERÊNCIAS

- ABE, H., YAMASHITA, S., ITOH, T., SATOH, T., HOSHI, H. Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro* matured and fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum free medium or in serum supplemented medium. **Molecular Reproduction and Development**, v.53, p.325-335,1999.
- ADONA PR, LEAL CLV. Effect of concentration and exposure period to butyrolactone I on meiosis progression in bovine oocytes. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.58, p.354-359, 2006.
- ADONA P. R.; PIRES P. R. L.; QUETGLAS M. D.; SCHWARZ K. R. L.; LEAL C. L. V. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. **Animal Reproduction Science**, v. 108, p. 49-68, 2008.
- AGARWAL A.; SALEH R. A.; BEDAIWY M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertil Steril**,v.79, p.829–843, 2003.
- ALBUZ, F. K. et al. Simulated physiological oocyte maturation (spom): A novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Hum Reprod**, v. 25, n. 12, p. 2999-3011, 2010.
- ALBERTINI DF. Cytoplasmic microtubular dynamics and chromatin organization during mammalian oogenesis and oocyte maturation. **Mutat Res** v.296, p.57–68, 1992.
- ALMODIN C. G.; MINGUETTI-CAMARA V. C.; PAIXAO C. L.; PEREIRA P. C. Embryo development and gestation using fresh and vitrified oocytes. **Human Reproduction**, v.25, p. 1192–1198, 2010.
- BARJA G. Mitochondrial Oxygen Consumption and Reactive Oxygen Species Production are Independently Modulated: Implications for Aging Studies. **Rejuvenation Res**, v.10, P.215-224, 2007.
- 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.
- BILODEAU-GOESEELS S. Effects of phosphodiesterase inhibitors on spontaneous nuclear maturation and cAMP concentrations in bovine oocytes. **Theriogenology** v.60, p.1679-1690, 2003.
- CELEGHINI ECC, ARRUDA RP, ANDRADE AFC, NASCIMENTO J, RAPHAEL CF. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reprod Domest Anim**, v.42, p.479-488, 2007.
- CHANKITISAKUL, V.; SOMFAI, T.; INABA, Y.; TECHAKUMPHU, M.; NAGAI, T. Supplementation of maturation medium with L-carnitine improves cryo-tolerance of bovine *in vitro* matured oocytes. **Theriogenology**, v. 79, n.4, p. 90–98, 2013.

- CHEN L. B. Mitochondrial membrane potential in living cells. **Rev. Cell Biol.** v.4, p. 155–181, 1988.
- DE MATOS, D.G.; HERRERA, C.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; VAN SOON, A.; NOGUIERA, D. Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine *in vitro* embryo production. **Mol.Reprod. Dev.**, v.62, p.203-202, 2002.
- DE SOUSA P. A.; SILVA S. J. M; ANDERSON R. A. Neurotrophin signaling in oocyte survival and developmental competence: A paradigm for cellular totipotency. **Cloning Stem Cells**, v.6, p.375-385, 2004.
- DEL COLLADO M.; SARAIVA N. Z.; LOPES F. L.; GASPAR R. C.; PADILHA L. C.; COSTA R. R.; ROSSI G. F.; VANTINI R.; GARCIA J. M. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during *in vitro* maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v., p., 2015.
- DELEUZE S.; GOUDET G. Cyteamine supplementation of *in vitro* maturation media: a review. **Reprod. Domest. Anim.**, v.45, p.476-482, 2010.
- DEMYDA-PEYRA S.; DORADO J.; HIDALGO M.; ANTER J.; DE LUCA L.; GENERO E.; MORENO-MILLAN M. Effects of oocyte quality, incubation time and maturation environment on the number of chromosomal abnormalities in IVF-derived early bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, p. 1077-1084, 2013.
- DODE M. A.; ADONA P. R. Developmental capacity of *Bos indicus* oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6-dimethylaminopurine. **Anim Reprod Sci**, v.65, p.171-180, 2001.
- DOWNS, S. M., MOSEY, J. L., AND KLINGER, J. Fatty-acid oxidation and meiotic resumption in mouse oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**,v.76,p.844–853, 2009.
- DUNNING,K. R., CASHMAN,K., RUSSELL,D. L., THOMPSON, J. G.,NORMAN, R. J., AND ROBKER, R. L. Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. **Biol. Reprod.**, v. 83, p.909–918, 2010.
- EPPIG J. J. The participation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in the regulation of meiotic maturation of oocytes in the laboratory mouse. **J Reprod Fertil Suppl**, v.38, p.3–8, 1989.
- EZOE K, YABUUCHI A, TANI T, MORI C, MIKI T, TAKAYAMA Y, BEYHAN Z, KATO Y, OKUNO T, KOBAYASHI T,KATO K. Developmental Competence of Vitrified-Warmed Bovine Oocytes at the Germinal- Vesicle Stage is Improved by Cyclic Adenosine Monophosphate Modulators during *In Vitro* Maturation. **Plos One**, doi:10.1371/journal.pone.0126801, 2015.

FEUGANG, J.M.; VAN LANGENDONCKT, A.; SAYOUD, H.; REES, J.F.; PAMPFER, S.; MOENS, A.; et al. Effect of prooxidant agents added at the morula/blastocyst stage on bovine embryo development, cell death and glutathione content. **Zygote**, v.11, p.107-125, 2003.

FERREIRA E. M.; VIREQUE A. A.; ADONA P. M.; MEIRELLES F. V.; FERRIANI R. A.; NAVARRO P. A. A. Maturação citoplasmática de oócitos bovinos: aquisição de competência para o desenvolvimento. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 32, p.172-181, 2009.

FURNUS C.C.; DE MATOS D.G.; PICCO S.; PERAL GARCÍA A P.; INDA A.M.; MATTIOLI G. ; ERRECALDE A.L. Metabolic requirements associated with GSH synthesis during in vitro maturation of cattle oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 109, p.89-88, 2008.

GARCIA, J.M. Produção *in vitro* de embriões bovinos: diferentes procedimentos. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.26, p.280, 1998.

GOLDSBOROUGH M. D.; TILKINS M. L.; PRICE P. J.; LOBO-ALFONSO J.; MORRISON J. R.; STEVENS M. E.; MENESES J.; PEDERSEN R.; KOLLER B.; LATOUR A. Serum-free culture of murine embryonic stem (ES) cells. **Focus**, v.20, p. 8-12; 1998.

GUEMRA S.; SANTO E. S.; ZANIN R.; MONZANI P. S.; SOVERNIGO T. C.; OHASHI O. M.; LEAL C. L. V.; ADONA P. R. Effect of temporary meiosis block during prematuration of bovine cumulus-oocyte complexes on pregnancy rates in a commercial setting for in vitro embryo production. **Theriogenology**, v.81, p.982-987, 2014.

GUÉRIN P.; EL MOUATASSIM S.; MÉNÉZO Y. Oxidative Stress and Protection Against Reactive Oxygen Species in the Pre-implantation Embryo and its Surroundings. **Human Reproduction Update**, v.7, p.175-189, 2001.

GUTNISKY C.; ALVAREZ G. M.; CETICA P. D.; DALVIT G. C. Evaluation of the Cryotech Vitrification Kit for bovine embryos. **Cryobiology**, v. 67, p.391-3, 2013.

HIRABAYASHI, Y.; TANIUCHI, S.; KOBAYASHI, Y. A quantitative assay of oxidative metabolism by neutrophils in whole blood using flow cytometry. **J. Immunol. Meth.**, v. 82, p. 253-259, 1985.

HOCHI S, KIMURA K, HANADA A. Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae. **Theriogenology**, 52:497-504, 1999.

JESSUS C.; RIME H.; HACCARD O.; VAN LINT J.; GORIS J.; MERLEVEDE W.; OZON R. Tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and p42 during meiotic maturation of *Xenopus* oocyte. Antagonistic action of okadaic acid and 6-DMAP. **Development**, v. 111, p. 813-20, 1991.

JOHNSON, M.H.; NARS-ESFAHANI, M.H. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*? **Bioessays.**, v.16, p.31-39, 1994.

LEHMKUHL, R.C.; MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A.D. et al. Desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular e submetidos a FIV. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.28, p.276, 2000.

LEIVAS F. G.; BRUM D. S.; MEZZALIRA A.; PILLA L. F. C.; BERNARDI M. L.; RUBIN M. I. B.; SILVA C. A. M. Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação sem controle de atmosfera gasosa. **Ciência Rural**, v.34, p. 219-224, 2004.

LI H. J.; SUTTON-MCDOWALL M. L.; WANG X.; SUGIMURA S.; THOMPSON J. G.; GILCHRIST R. B. Extending prematuration with Camp modulators enhances the cumulus contribution to oocyte antioxidant defence and oocyte quality via gap junctions. **Human Reproduction**, v.31, p. 810–821, 2016.

LOIOLA M. V. G.; CHALHOUB M.; RODRIGUES A. S.; FERRAZ P. A.; BITTENCOURT R F.; RIBEIRO FILHO A. L. Validação de um Programa de Produção In Vitro de Embriões Bovinos com Transporte de Oócitos e de Embriões por Longas Distâncias. **Cienc. anim. bras.**, v.15, p. 93-101, 2014.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; KANKA, J. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment alter fertilization and the implications for blastocyst quality. **Reproduction**, v.126, p.333-346, 2003.

LONERGAN P, MONAGHAN P, RIZOS D, BOLAND MP, GORDON I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and development competence following maturation, fertilization and culture in vitro. **Mol Reprod Dev**, v. 37, p.48-53, 1994.

MACHATKOVA M, KRAUSOVA K, JOKESOVA E, TOMANEK M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. **Theriogenology**, v.61, p.329–35, 2004.

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

MERTON J.S.; KNIJN H.M.; FLAPPER H.; DOTINGA F.; ROELEN B.A.J.; VOS P.L.A.M.; MULLAART E. Cysteamine supplementation during in vitro maturation of slaughterhouse- and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf characteristics. **Theriogenology**, v. 80, p. 365-371, 2013.

MINGOTI G. Z.; CASTRO V. S. D. C.; MEO S. C.; BARRETTO L. S. S.; GARCIA J. M. The effects of macromolecular and serum supplements and oxygen tension during bovine in vitro procedures on kinetics of oocyte maturation and embryo development. **In Vitro Cell.Dev.Biol.Animal**, v.47, p.361–367, 2011.

MIRANDA, M.S.; CARVALHO, C.M.F; CORDEIRO, M.S.; SANTOS, S.S.D.; OHASHI, O.M. Sistemas alternativos de incubação e meios de cultivo para produção

in vitro de embrião bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.218-223, 2007.

NEANT I. & GUERRIER P. 6-dimetilaminopurina blocos de estrela do mar a maturação do oócito através da inibição da actividade de uma proteína cinase relevante. **Exp. Cell Res**, v.176, p. 68-79, 1988.

NEVES J. P.; MIRANDA K. L.; TORTORELLA R. D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista brasileira de Zootecnia**, v.39, p. 414-421, 2010.

NORDBERG, J, ARNER, ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic. Biol. Med.** v.31, p.1287-1312, 2001.

ORSI N. M.; LEESE H. J. Protection against reactive oxygen species during mouse preimplantation development: role of EDTA, oxygen tension, catalase, superoxide dismutase and pyruvate. **Molecular Reproduction and Development**, v. 59, p. 44-53, 2001.

PEGG D. E . Princípios de criopreservação. **Methods Mol Biol.**, v. 368, p. 39-57, 2007.

PONTES, J. H. F.; STERZA, F. A. M.; BASSO, A. C.; FERREIRA, C. R.; SANCHES, B. V.; RUBIN, K. C. P.; SENEDA, M. M. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 75, p. 1640–1646, 2011.

PHONGNIMITR T; LIANG Y.; K.; SRIRSTTANA K.; PANYAWAI K.; SRIPUNYA N.; TREETAMPINICH C.; PARNPAI R. Effect of L-carnitine on maturation, cryo-tolerance and embryo developmental competence of bovine oocytes. **Animal Science Journal**, V. 11, p. 719-725, 2013.

RATY M.; KETOJA E.; PITKANEN T.; AHOLA V.; KANANEN K.; PEIPPO J. In vitro maturation supplements affect developmental competence of bovine cumulus-oocyte complexes and embryo quality after vitrification. **Cryobiology**, v.63, p.245-255, 2011.

RIZOS, D., FAIR, T., PAPADOPUOLOS, S., BOLAND, M., LONERGAN, P. Developmental, quality and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. **Molecular Reproduction and Developmental.**,v.62, p.320-327, 2002.

ROCHA-FRIGONI N. A. S.; LEÃO B. C. S.; NOGUEIRA E.; ACCORSI M. F.; MINGOTI G. Z. Reduced levels of intracellular reactive oxygen species and apoptotic status are not correlated with increases in cryotolerance of bovine embryos produced in vitro in the presence of antioxidants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.26, p.797-805, 2014.

ROSE R. D.; GILCHRIST R. B.; KELLY J. M.; THOMPSON J. G.; SUTTON-MCDOWALL M. L. Regulation of sheep oocyte maturation using cAMP modulators. **Theriogenology** , v.79, P. 142–148, 2013.

RUSSELL F. D.; BAQIR S.; BORDIGNON J.; BETTS D.H. The Impact of Oocyte Maturation Media on Early Bovine Embryonic Development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 1255-1270, 2006.

SHIRAZI A.; ARDALI M. A.; AHMADI E.; NAZARI H.; MAMUEE M.; HEIDARI B. O Efeito da macromolécula Fonte e tipo de mídia Durante a maturação *in vitro* de ovelhas Oócitos sobre o desenvolvimento embrionário subsequente. **J Reprod infértil**, v.13, p. 13-9, 2012.

SILVA L. K.; REIS A. N.; SILVA A. O. A.; SOUSA J. S.; SOUZA A. J. O.; VALE W. G. Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação por diferentes períodos de tempo sem controle da atmosfera gasosa. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.63, p.74-80, 2011.

SIMILI M.; PELLERANO P.; PIGULLO S.; TAVOSANIS G.; OTTAGGIO L.; DE SAINT-GEORGES L.; BONATTI S. Inibição 6DMAP de eventos do ciclo celular precoce e indução de anomalias mitóticas. **Mutagênese**, v. 12, p. 313-9, 1997.

SOUZA-FABJAN J. M.; PEREIRA A. F.; MELO C. H.; SANCHEZ D. J.; OBA E.; MERMILLOD P.; MELO L. M.; TEIXEIRA D. I.; FREITAS V. J. Avaliação dos parâmetros reprodutivos, a recuperação de oócitos laparoscópica e os primeiros embriões produzidos *in vitro* a partir de cabras Canindé ameaçadas (*Capra hircus*). **Reprod Biol.**, v. 13, p. 325-32, 2013.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P. B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. **Biology of Reproduction**. v. 64, p. 904-909, 2001.

SRIVASTAVA S.; SRIVASTAVA A. K.; SUPRASANNA P.; AND D'SOUZA S. F. Comparative biochemical and transcriptional profiling of two contrasting varieties of *Brassica juncea* L. in response to arsenic exposure reveals mechanisms of stress perception and tolerance. **J. Exp. Bot.**, v.60, p. 3419-3431, 2009.

TRIPATHI A., PREM KUMAR K. V., CHAUBE S. K. Meiotic Cell Cycle Arrest in Mammalian Oocytes. **Journal of Cellular Physiology**, doi: 10.1002/jcp.22108, 2010.

UFER, C.; WANG, C.C; BORCHERT, B.; HEYDECK, D.; KUHN, H. Redox control in mammalian embryo development. **Antioxidants & Redox Signaling.**, v.13; p.836-875, 2010.

VAJTA G., HOLM P., KUWAYAMA M., BOOTH P.J., JACOBSEN H., GREVE T., CALLESEN H. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, 53–58, 1998.

WEBSTER H. L. Colloid osmotic pressure: theoretical aspects and background. **Clin Perinatol**, v.9, p. 505–521, 1982.

WOWK B. Thermodynamic aspects of vitrification. **Cryobiology**, v. 60, p. 11-22, 2010.

YANG, X.; KUBOTA C.; SUZUKI H.; TANEJA M.; BOLS P.E.; PRESICCE G.A. Control of oocyte maturation in cows: biological factors. **Theriogenology**, v. 49, p. 471–82, 1998.

ZENG HAI-TAO; RICHANI D.; SUTTON-MCDOWALL M. L.; ZI REN, SMITZ J. E. J.; STOKES Y.; GILCHRIST R. B.; THOMPSON J. G. Prematuration with Cyclic Adenosine Monophosphate Modulators Alters Cumulus Cell and Oocyte Metabolism and Enhances Developmental Competence of In Vitro- Matured Mouse Oocytes. **Biology of Reproduction**, v.91, p.1-11, 2014.

ZUELKE K. A.; BRACKETT B. G. Luteinizing hormone-enhanced in vitro maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. **Biol Reprod**, v.43, p.784–787; 1990.



## CAPÍTULO 2 – SUPLEMENTAÇÃO COM MODULADORES DE AMPc E ANTIOXIDANTES DURANTE O TRANSPORTE DE OÓCITOS BOVINOS E SEUS EFEITOS SOBRE A MATURAÇÃO NUCLEAR E CITOPLASMÁTICA E SOBRE A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

**RESUMO** - O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da suplementação com bloqueadores da meiose e antioxidantes durante o transporte de oócitos bovinos por 6 horas sobre: 1) progressão da maturação nuclear; 2) maturação citoplasmática e 3) competência no desenvolvimento e criotolerância dos embriões produzidos. Para tanto, o meio de transporte de oócitos foi suplementado com forskolina e IBMX, e os antioxidantes cisteína, cisteamina e catalase. Os oócitos foram incubados em incubadora portátil (Minitub®) para simulação de transporte, durante 6h. Posteriormente, foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV) em incubadora a 5% de CO<sub>2</sub> em ar até completar 24h e, em seguida, foram fecundados e os prováveis zigotos foram cultivados *in vitro* durante 7 dias. Foi feito um grupo controle neste experimento: MIV com 10% de SFB, em incubadora por 24h (Controle). Foram avaliadas a cinética da maturação nuclear e maturação citoplasmática (pelos seguintes parâmetros: avaliação do posicionamento de mitocôndrias, do potencial de membrana mitocondrial e do conteúdo intracelular de espécies reativas do oxigênio) após o transporte e após a MIV. Foram feitas a avaliação da taxa de clivagem (48 hpi), do desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos (168 hpi) e taxa de re-expansão após 24 horas de re-cultivo. A taxa de oócitos em GV foi maior nos oócitos ( $P<0,05$ ) do grupo Transporte com bloqueador (37,9%) e menor no grupo Transporte sem bloqueador (10,1%) ambos estes grupos difeririam do grupo Controle (20,0%). Nos oócitos dos grupos tratados com antioxidantes, após 6h de transporte, a concentração intracelular de ROS foi maior ( $P<0,05$ ) no grupo Transporte sem antioxidantes (1,5) e menor nos grupos Controle (1,0) e Transporte com antioxidantes (1,1). Com relação ao tratamento com bloqueadores, a contração de ROS foi maior ( $P<0,05$ ) nos oócitos do grupo Transporte sem bloqueadores (1,5) e menor nos grupos Controle (1,0) e Transporte com bloqueador (1,2). Após 24 horas de MIV houve interação entre os tratamentos (bloqueadores+antioxidantes), sendo que os oócitos dos grupos Transporte Pré-MIV com antioxidantes (1,0) e Controle (1,0) apresentaram a maior concentração de ROS ( $P<0,05$ ), enquanto que os grupos Transporte Controle (0,6) e Transporte Pré-MIV (0,5) exibiram as menores concentrações de ROS. Com relação ao potencial de membrana de mitocondrial (PMM), houve interação entre os tratamentos quando os oócitos foram avaliados após 6 e 24 horas. Após 6 horas Transporte Pré-MIV (1,00) e Controle (0,9±0,08) apresentaram o maior ( $P<0,05$ ) PMM, e os grupos Transporte Pré-MIV com antioxidantes (0,6) e Transporte Controle (0,6) menor PMM. Após 24 horas, os grupos Controle (1,00) e Transporte Pré-MIV com antioxidantes (0,8) apresentaram o maior PMM, e diferiram ( $P<0,05$ ) dos demais grupos (0,5-0,6). A adição de inibidores da meiose (IBMX associado à forskolina) e antioxidantes, ao meio de transporte de oócitos bovinos permite um transporte adequado por 6h, preservando a qualidade e integridade dos oócitos e proporcionando condições de maturação

oocitária semelhante à obtida *in vitro* a partir de oócitos que não foram submetidos ao transporte.

**Palavras-chave:** Transporte, oócito bovino, antioxidantes, bloqueador da meiose, maturação *in vitro*

## SUPPLEMENTATION WITH CAMP MODULATORS AND ANTIOXIDANTS DURING THE TRANSPORT OF BOVINE OOCYTES AND EFFECTS ON NUCLEAR AND CYTOPLASMIC MATURATION AND ON PRODUCTION IN VITRO EMBRYOS

**Abstract** - The objective of this study was to evaluate the effects of supplementation with antioxidants blockers meiosis and during transport of bovine oocytes for 6 hours on: 1) progression of nuclear maturation; 2) cytoplasmic maturation and 3) competence in the development and cryotolerance of embryos produced. Therefore, the means of transport of oocytes was supplemented with forskolin and IBMX, and antioxidants cysteine, cysteamine and catalase. Oocytes were incubated in a portable incubator (Minitub®) for transport simulation for 6h. They were posteriorly submitted *in vitro* maturation (IVM) in an incubator in 5% CO<sub>2</sub> in air at to complete 24 hours and then were fertilized and presumptive zygotes were cultured *in vitro* for 7 days. A control group was done in this experiment: IVM with 10% FCS for 24 hours (Control). The kinetics of nuclear maturation and cytoplasmic maturation (made by the following parameters: evaluation of positioning of mitochondria, the mitochondrial membrane potential and intracellular content of reactive oxygen species) were evaluated after transport and after IVM. They were made to evaluate the rate of cleavage (48 hpi) and embryo development to the blastocyst stage (168 hpi), and the rate of re-expansion after 24 hours of re-cultivation. The rate of oocytes in the GV oocytes was higher ( $P < 0.05$ ) of Transport with Blocker group (37.9%) and lower in the group Transport (10.1%) of these two groups differed from Control group (20.0%). In oocytes treated groups antioxidants, after 6 hours of transport, the intracellular concentration of ROS was higher ( $P < 0.05$ ) in group Transport (1.5) and lower in the Control (1.0) and Transport with Antioxidants (1.1) groups. Regarding the treatment with blockers, ROS concentration was higher ( $P < 0.05$ ) in the oocytes Transport group (1.5) and lower in Control (1.0) and Transport with Blockers (1.2). After 24 hours of IVM interaction was observed between treatments (blockers+antioxidants), and the groups of Transport Pre-IVM + Atx (1.0) and Control (1.0) had the highest concentration of ROS ( $P < 0.05$ ), while Transport Control (0.6) and Transport Pre-IVM (0.5) exhibited the lowest concentrations of ROS. Regarding the mitochondrial membrane potential (MMP), there was an interaction between treatments when the oocytes were evaluated after 6 and 24 hours. After 6 hours Transport Pre-IVM (1.00) and Control (0.9 ± 0.08) had the highest MMP ( $P < 0.05$ ) and Transport Pre-IVM + Atx (0.6) and Transport Control (0.6) groups lower MMP. After 24 hours, the Contr (1.00) and Transport Pre-IVM + Atx (0.8) groups had the highest MMP, and differ ( $P < 0.05$ ) from de others groups (0.5 to 0.6). The addition of meiosis inhibitor (IBMX associated with forskolin), and antioxidants, in the oocytes transport medium permits adequate transport for 6h, preserving the quality and integrity of the oocyte and providing oocyte maturation conditions similar to that obtained *in vitro* from oocytes that were not submitted to transport.

**Keywords:** Transport, bovine oocyte, antioxidants, blocker meiosis, *in vitro* maturation.

## INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos apresenta limitações quando comparada com a produção *in vivo*, pois a taxa de blastocistos produzidos *in vitro* é aproximadamente 35% enquanto que, *in vivo*, a taxa se aproxima de 80% (LONERGAN et al., 2007). Esta diferença se deve principalmente à qualidade do oócito, que é um fator determinante para o futuro desenvolvimento do blastocisto (LONERGAN et al., 2016). Isto se deve à retomada da meiose de forma espontânea, a qual ocorre quando os oócitos são aspirados dos folículos para utilização em programas de PIVE. A precoce progressão meiótica leva à assincronia entre a maturação nuclear e citoplasmática, o que influencia negativamente na qualidade do oócito (GILCHRIST e THOMPSON, 2007; ROSE et al., 2013; HUANG et al., 2013).

A maturação do oócito envolve a maturação nuclear e a maturação citoplasmática. A maturação nuclear compreende diversas etapas da progressão da meiose, que inclui duas divisões consecutivas dos cromossomos (fases M) sem que haja nova replicação de DNA (fase S). Nos oócitos, a meiose progride até o estágio de metáfase II (MII), quando ocorre um bloqueio meiótico que se estende até a fecundação. A penetração do espermatozóide é o estímulo que ativa a conclusão do ciclo meiótico e inicia o desenvolvimento embrionário (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). A maturação citoplasmática inclui a redistribuição das organelas celulares, migração das mitocôndrias para a posição perinuclear e acúmulo de grânulos ao longo do oolema, reorganização do citoesqueleto e a síntese e armazenamento de proteínas, além de conferir ao oócito as condições necessárias para que haja o bloqueio da polispermia em caso de fecundação (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005; HYTTEL et al., 1986; LONERGAN et al., 2016).

Na maturação nuclear, o ambiente folicular é responsável tanto pelo bloqueio meiótico em Profase I (vesícula germinativa) quanto para a retomada da meiose. *In vivo*, a manutenção do oócito em bloqueio meiótico é marcada por elevados níveis intraocitário de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), sendo que o pico pré-ovulatório de LH é responsável pela retomada da meiose. Na progressão da meiose ocorre a interrupção da comunicação (via junções GAP) entre células do *cumulus* (CCs) e oócito, promovendo a interrupção da transferência de

monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) para o oócito. Esta diminuição nos níveis de GMPc leva à ativação da fosfodiesterase 3A (PDE3A) e aumento na hidrólise de AMPc, diminuindo assim seus níveis intraocitário e provocando a retomada da meiose (LONERGAN 2016).

Foi descrito que a inibição temporária da retomada da meiose, através do cultivo com moduladores de AMPc antes da maturação (pré-maturação) pode simular alguns processos da maturação do oócito que ocorre *in vivo* e, desta forma, levar ao maior desenvolvimento da competência oocitária (LUCIANO et al., 1999; GUIXUE et al., 2001; SHU et al., 2008; ALBUZ et al., 2010; ROSE et al., 2013; ZENG et al., 2013, 2014; FRANCIOSI et al., 2014; RICHANI et al., 2014).

Para evitar a queda dos níveis de AMPc durante a pré-MIV pode-se utilizar algum inibidor inespecífico de PDE, como 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), em conjunto com a forskolina, que é um ativador da enzima adenilato ciclase e atua estimulando a síntese de AMPc pelo complexo *cumulus*-oócitos (COC) (FUNAHASHI et al., 1997; GILCHRIST, 2011). A utilização da forskolina juntamente com o IBMX durante a pré-MIV mostrou efeito positivo sobre a competência oocitária e a taxa de desenvolvimento embrionário (ALBUZ et al., 2010; ZENG et al., 2013, 2014; RICHANI et al., 2014), além de prolongar a comunicação, via junções GAP, entre células do *cumulus* e oócito (THOMAS et al., 2004; SHU et al., 2008; LUCIANO et al., 2011; FRANCIOSI et al., 2014). A ligação bidirecional entre as CCs e oócito permite a transferência de diversos nutrientes e pequenas moléculas essenciais para o crescimento do oócito e para suportar, futuramente, o início do desenvolvimento do embrionário. Um dos fatores transferidos entre CCs e oócitos é a glutathiona (GSH), a qual atua como agente antioxidante na maturação do oócito, fertilização e no desenvolvimento embrionário (DE MATOS et al., 1997, 2002; TAKASHI et al. 2002; CURNOW et al., 2008; TAKEO et al., 2015). Foi sugerido por Li et al. (2016) que um dos mecanismos pelo qual a pré-MIV, com moduladores de AMPc, melhora a competência do oócito, está em facilitar a transferência e acúmulo da GSH das CCs para o oócito.

A presença do aminoácido cisteína no meio de cultivo é um fator limitante para a síntese de GSH pelo oócito, porém a cisteína é rapidamente oxidada em cistina, o que limita a síntese. A cisteamina, componente thiol de baixo peso

molecular, reduz a cistina em cisteína, disponibilizando sua captação pela célula. Logo, a adição de cisteína juntamente com a cisteamina vai estimular a síntese e aumentam a concentração intracelular do GSH (TAKAHASHI *et al.*, 2002; WOLF, 2005). Entretanto, a glutathione não está presente no meio extracelular e, por isso, a adição da catalase, antioxidante enzimático extracelular, ao meio também pode ter efeito positivo, visto que este antioxidante promove a redução das ROS e da apoptose em embriões bovinos (ROCHA-FRIGONI *et al.*, 2013).

A adição de antioxidantes ao meio MIV pode melhorar a qualidade e beneficiar o desenvolvimento embrionário, visto que a elevada pressão parcial de O<sub>2</sub> (aproximadamente 20% de O<sub>2</sub> atmosférico) durante a PIV resulta em aumento na produção de ROS, diferentemente do que ocorre *in vivo* (3-9% O<sub>2</sub> no interior do lúmen do trato reprodutivo das fêmeas) (LIM *et al.*, 1999; MASTROIANNI & JONES, 1965; WATSON *et al.*, 1994; BAVISTER, 1995).

Conforme Raty *et al.* (2011), as condições de maturação podem influenciar a qualidade dos embriões produzidos *in vitro*. Portanto, a suplementação do meio de transporte de oócitos bovinos com moduladores de AMPc e antioxidantes, num sistema de pré-MIV, pode otimizar o período de transporte, além de sua possível influência positiva sobre a qualidade e viabilidade dos oócitos e sobre o futuro desenvolvimento e criotolerância dos embriões. Deste modo, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da pré-MIV com moduladores de AMPc (forskolina e IBMX) e antioxidantes (cisteína, cisteamina e catalase) durante a simulação de transporte por 6 horas, seguido do cultivo MIV por 18 horas adicionais, sobre a maturação nuclear, concentração intracelular de ROS, potencial de membrana mitocondrial, distribuição das mitocôndrias, o desenvolvimento embrionário e a criotolerância dos embriões.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Reagentes químicos**

Os reagentes químicos utilizados foram adquiridos da empresa Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), caso contrário estão especificados no texto. Materiais plásticos e tubos foram obtidos da empresa Corning Inc. (Acton, MA, USA).

### **Obtenção e seleção de oócitos**

Os ovários de bovinos abatidos nos frigoríficos da região de Araçatuba-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 3 horas desde o abate até o início das aspirações. As punções foliculares foram realizadas manualmente, com auxílio de agulha de calibre 18-G adaptada a seringa de 10 ml, ambas descartáveis, sendo que foram aspirados apenas os folículos com diâmetro entre 3 a 8 mm. Todo o material aspirado foi transferido para tubos plásticos de 50 ml, os quais ficaram em repouso (decantação) por 15 minutos para posterior seleção dos oócitos. O sedimento foi transferido para placas de poliestireno de 60 mm de diâmetro e avaliado em microscópio estereoscópico. Os oócitos foram selecionados em fluido folicular puro, o qual foi obtido do sobrenadante dos tubos de aspiração, em cada réplica do experimento; o fluido foi centrifugado à 12500 x *g* por 5 minutos, em seguida o sobrenadante foi recuperado e acrescido 75µl/ml de penicilina/estreptomicina. Apenas oócitos com *cumulus* compacto (complexos *cumulus*-oócito - COCs), contendo pelo menos quatro camadas de células e de aparência saudável (citoplasma de granulação homogênea) foram selecionados para os experimentos. Os COCs selecionados foram lavados duas vezes em fluido folicular e duas vezes em meio TCM-199 (suplementado com 0,2 mM de piruvato, 75 µg de amicacina e 0,3% BSA). Posteriormente, foram destinados aos procedimentos subsequentes.

### **Simulação do transporte**

Os oócitos selecionados foram submetidos à simulação de transporte anteriormente ao cultivo de maturação *in vitro*. Os COCs foram acondicionados em criotubos (25 COCs/criotubo) contendo 500 µl de: 1) meio de transporte (TCM-199 suplementado com 0,2 mM de piruvato, 25 mM de bicarbonato de sódio e 75 µg de

amicacina) acrescido de 0,3% de BSA, 100  $\mu$ M de forskolina e 500  $\mu$ M de IBMX; 2) meio de transporte acrescido de 0,3% de BSA, 100  $\mu$ M de forskolina, 500  $\mu$ M de IBMX e mistura de antioxidantes, conforme preconizado por Rocha-Frigoni (2014) [100  $\mu$ M de cisteamina associada a 0,6 mM de seu precursor, a cisteína (DELEUZE & GOUDET, 2010; ALI et al., 2003) e 100 UI catalase (ORSI & LEESE, 2001)]; 3) meio de maturação B-199 (TCM-199 suplementado com 0,2 mM de piruvato, 25 mM de bicarbonato de sódio, 75  $\mu$ g de amicacina, 1  $\mu$ g de 17- $\beta$  estradiol/ml, 0,5  $\mu$ g de FSH/ml e 100 UI de hCG/ml) acrescido de 0,6% de BSA; ou 4) meio de maturação B-199 acrescido de 0,6% de BSA e mistura de antioxidantes. O meio foi coberto com 400  $\mu$ l óleo mineral e os criotubos foram gaseificados com mistura gasosa contendo 5% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub> em balanço. A seguir, foram acondicionados em incubadora portátil (Minitub) à 38,5°C durante 6 horas.

### **Maturação *in vitro***

Após a simulação de transporte, os oócitos foram transferidos para microgotas de 100  $\mu$ l de meio de maturação B-199 suplementado com 10% de SFB, recobertas com óleo mineral. O meio de maturação dos oócitos que foram submetidos ao transporte simulado na presença da mistura de antioxidantes também recebeu suplementação com a mistura (0,6 mM cisteína + 100  $\mu$ M cisteamina + 100 UI catalase); o meio de MIV dos demais oócitos não foi suplementado com a mistura. O cultivo de maturação foi conduzido em incubadora (Thermo Forma) com temperatura de 38,5°C, máxima umidade e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar, por mais 18 horas. Desta forma, o tempo total de cultivo de maturação foi de 24 horas (6 horas em transporte simulado em incubadora portátil e mais 18 horas em incubadora de CO<sub>2</sub>).

Oócitos do grupo controle (Controle Incubadora SFB) foram maturados em microgotas de 100  $\mu$ l de meio de maturação B-199 suplementado com 10% de SFB, recobertas com óleo mineral, em incubadora com temperatura de 38,5°C, máxima umidade e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar, por 24 horas.

A descrição dos grupos experimentais pode ser melhor visualizada no item *Delineamento Experimental*.



### **Avaliação da maturação nuclear**

Os oócitos foram desnudados por sucessivas pipetagens em solução de hialuronidase 0,2% em PBS, acrescida de 1% PVP. Posteriormente, foram fixados em paraformaldeído 4% por 10 minutos e foram permeabilizados em solução de Triton X-100 0,5% em citrato de sódio 0,1% por 5 minutos. Em seguida, foram corados com 1 µg/mL de Hoechst 33342 por 15 minutos, no escuro, em temperatura ambiente. Posteriormente, foram avaliados em microscópio invertido equipado com epifluorescência (Olympus, IX51; excitação 404 nm e emissão 526 nm) para determinação do estadió da meiose. Os oócitos foram classificados em imaturos (configuração nuclear em vesícula germinativa - VG), maduros (metáfase II - MII) e em estadios intermediários (Int.) da meiose (quebra da vesícula germinativa - GVBD, metáfase I - MI, anáfase I – AI ou telófase I - TI).

### **Avaliação da distribuição citoplasmática das mitocôndrias e do potencial de membrana mitocondrial**

Para avaliação da distribuição citoplasmática das mitocôndrias e do potencial de membrana mitocondrial (PMM), os oócitos foram desnudados e corados com a sonda fluorescente MitoTracker Red® (CMXROs, Molecular Probes, Invitrogen, Oregon, USA), de acordo com as informações do fabricante. Os oócitos foram incubados no escuro por 30 minutos em PBS com 1% de PVP acrescido de 500 nM de MitoTracker Red® CMXROs, em temperatura de 37°C. Posteriormente, foram lavados três vezes em PBS e avaliados imediatamente em microscópio invertido equipado com epifluorescência (Olympus, IX51), sob excitação de 543 nm e emissão de 575 nm. As imagens obtidas foram armazenadas e, após conversão para escala de cinza, foram analisadas com auxílio do software Q-Capture Pro Image (Media Cybernetics, Inc., Versão 5.0.1.26) para quantificação da intensidade de fluorescência emitida, mensurada em pixels. A intensidade do sinal de “background” foi subtraída dos valores medidos das imagens. Um grupo experimental foi escolhido como calibrador (grupo Controle Incubadora SFB) e o

valor de cada imagem foi dividido pela média do calibrador para gerar os níveis de expressão relativa de fluorescência (unidades arbitrárias de fluorescência - UAF). Quanto maior a intensidade de fluorescência, maior o PMM. Os oócitos foram também classificados de acordo com a distribuição citoplasmática de mitocôndrias (distribuição periférica: oócitos imaturos; distribuição dispersa: oócitos maduros; transição: oócitos parcialmente maduros).

### **Mensuração do conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio pelo ensaio com diclorofluoresceína**

Os níveis intracelulares de ROS ( $H_2O_2$ ,  $HO\cdot$ ,  $ROO\cdot$ ) foram quantificados através da utilização da sonda fluorescente diacetato de 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína ( $H_2DCFDA$ ; Molecular Probes, Invitrogen). Resumidamente, os oócitos foram lavados duas vezes em PBS e incubados em  $5 \mu M$  de  $H_2DCFDA$  durante 30 minutos no escuro,  $38^\circ C$  e 5%  $CO_2$  em ar. Os oócitos foram então lavados duas vezes em PBS e analisados imediatamente em microscópio invertido, sob excitação de 495 nm e emissão de 520 nm. As imagens obtidas foram armazenadas e, após conversão para escala de cinza, foram analisadas com auxílio do software Q-Capture Pro Image para quantificação da intensidade de fluorescência emitida, mensurada em pixels. A intensidade do sinal de "background" foi subtraída dos valores medidos das imagens. O grupo Controle Incubadora SFB foi escolhido como calibrador e o valor de cada imagem foi dividido pela média do calibrador para gerar os níveis de expressão relativa de fluorescência (expressos em UAF).

### **Fertilização *in vitro***

Foi utilizado o sêmen de um único touro e da mesma partida. A palheta de sêmen foi descongelada à temperatura de  $36^\circ C$  por 40 segundos e os espermatozoides vivos foram obtidos por centrifugação em gradiente de densidade descontínua (45 e 90%) de Percoll durante 7 minutos a  $2500 \times g$  em temperatura ambiente. O sedimento recuperado foi avaliado quanto ao volume, concentração e motilidade espermática. A concentração final foi ajustada para  $25 \times 10^6$  de

espermatozoides vivos por ml de meio fecundação (TALP-FIV; PARRISH et al., 1988) suplementado com 40 µl/ml solução de PHE (1 mM de hipotaurina, 2 mM de penicilamina e 250 mM de epinefrina) e 10 µg/ml de heparina. Aproximadamente  $100 \times 10^3$  espermatozóides foram adicionados a cada gota de 100 µl de meio TALP-FIV designado para cada grupo experimental. Os COCs foram lavados duas vezes em meio TCM-199 HEPES, suplementado com 0,5% de BSA livre de ácidos graxos, e uma vez em meio TALP-FIV. Foram adicionados 25 COCs por microgota de FIV, sendo estes co-incubados a 38,5°C, por 18 horas, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar.

### **Cultivo embrionário *in vitro***

O cultivo embrionário foi realizado em microgotas contendo 100 µl de meio SOF (VAJTA *et al.*, 1999) suplementado com 0,5% de BSA e 2,5% de SFB, recobertas com óleo mineral e mantidas em temperatura de 38,5°C, atmosfera 5% de CO<sub>2</sub> em ar, por até 7 dias.

Após 72 horas do cultivo, 50% do meio de cultivo foi renovado. A clivagem foi avaliada 48 horas pós-inseminação (hpi), e o desenvolvimento embrionário foi avaliado 144 e 168 hpi.

### **Vitrificação e aquecimento dos embriões**

Os procedimentos utilizados para vitrificação e aquecimento foram realizados de acordo com o protocolo Vitri-Ingá® (Ingámed, Paraná, Brasil), sendo os meios e hastes adquiridos desta empresa.

Os blastocistos expandidos obtidos no dia 7 do CIV e classificados em grau 1 e 2, de acordo com o Manual da IETS (WRIGHT, 2009), foram selecionados para vitrificação. Os embriões foram lavados duas vezes em solução de manutenção sem crioprotetores (“Holding”) antes de serem transferidos para a solução VI-I de vitrificação, durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente, foram transferidos para solução VI-II, durante 60 segundos em temperatura ambiente. Os embriões foram então depositados na porção final da haste de vitrificação com o mínimo volume de

meio. Os protetores das hastes foram colocados horizontalmente no vapor de nitrogênio (N<sub>2</sub>) líquido por alguns minutos antes de iniciar o procedimento, para então serem mergulhados verticalmente de modo a ficarem totalmente submersos. Finalmente, as hastes contendo os embriões foram introduzidas no protetor, sendo então armazenadas em botijões criogênicos até o momento do uso nas etapas posteriores.

Para aquecimento dos embriões, as hastes foram retiradas do N<sub>2</sub> e a extremidade contendo os embriões foi imersa em solução DV-I de desvitrificação durante 1 minuto, a 37°C, até que a microgota fosse desfeita. Em seguida, os embriões foram transferidos para a solução DV-II por 3 minutos em temperatura ambiente e, finalmente, para a solução DV-III por 10 minutos em temperatura ambiente. Por fim, foram lavados duas vezes em solução de lavagem em temperatura ambiente e cultivados em meio SOF por 24 horas em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> em ar. Ao final do período, foram avaliadas as taxas de re-expansão embrionária (sobrevivência *in vitro*).

## DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os COCs selecionados foram divididos em 5 grupos experimentais, conforme descrito a seguir e como exposto na Figura 1:

- (1) **Controle Incubadora (Contr):** Os oócitos foram maturados em meio B-199 suplementado com 10% SFB por 24 horas em incubadora de bancada (Thermo Forma).
- (2) **Transporte Controle (Transp Contr):** COCs foram submetidos à simulação de transporte, em meio B-199 suplementado com 0,6% BSA por 6 horas em incubadora portátil (Minitub). A seguir, foram maturados em meio B-199 suplementado com 10% SFB por 18 horas em incubadora de bancada.
- (3) **Transporte Atx (Transp Contr+Atx):** COCs foram submetidos à simulação de transporte, em meio B-199 suplementado com 0,6% de BSA e mistura de antioxidantes (Atx: 100 µM de cisteamina, 0,6 mM de cisteína e 100 UI catalase) por 6 horas em Minitub. A seguir, foram maturados em meio B-199

suplementado com 10% SFB e mistura de antioxidantes por 18 horas em incubadora de bancada.

- (4) **Transporte com Pré-MIV (Transp Pré-MIV):** COCs foram submetidos à simulação de transporte (pré-MIV), em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA, 100  $\mu$ M Forskolina e 500  $\mu$ M IBMX, por 6 horas em Minitub. A seguir, foram maturados em meio B-199 suplementado com 10% SFB por 18 horas em incubadora de bancada.
- (5) **Transporte com Pré-MIV+Atx (Transp Pré-MIV+Atx):** COCs foram submetidos à simulação de transporte (pré-MIV), em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA, 100  $\mu$ M Forskolina, 500  $\mu$ M IBMX e mistura de antioxidantes por 6 horas em Minitub. A seguir, foram MIV em meio B-199 com 10% SFB e mistura de antioxidantes por 18 horas em incubadora de bancada.

Uma parte dos oócitos foi avaliada ao final do transporte simulado (6 horas) e após o cultivo de MIV (24 horas de cultivo: transporte + MIV) pela coloração com Hoechst 33342 para determinação do momento final de conclusão da maturação (MII). A maturação citoplasmática foi avaliada pela quantificação do conteúdo intracelular de ROS (coloração com H<sub>2</sub>DCFDA) e pelo reposicionamento das mitocôndrias e potencial de membrana mitocondrial (coloração com MitoTracker Red<sup>®</sup>).

O restante dos oócitos foi submetido à fecundação *in vitro* e foi avaliado o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos. Os embriões produzidos foram vitrificados e a criotolerância destes foi avaliada após o aquecimento e cultivo por 24 horas.

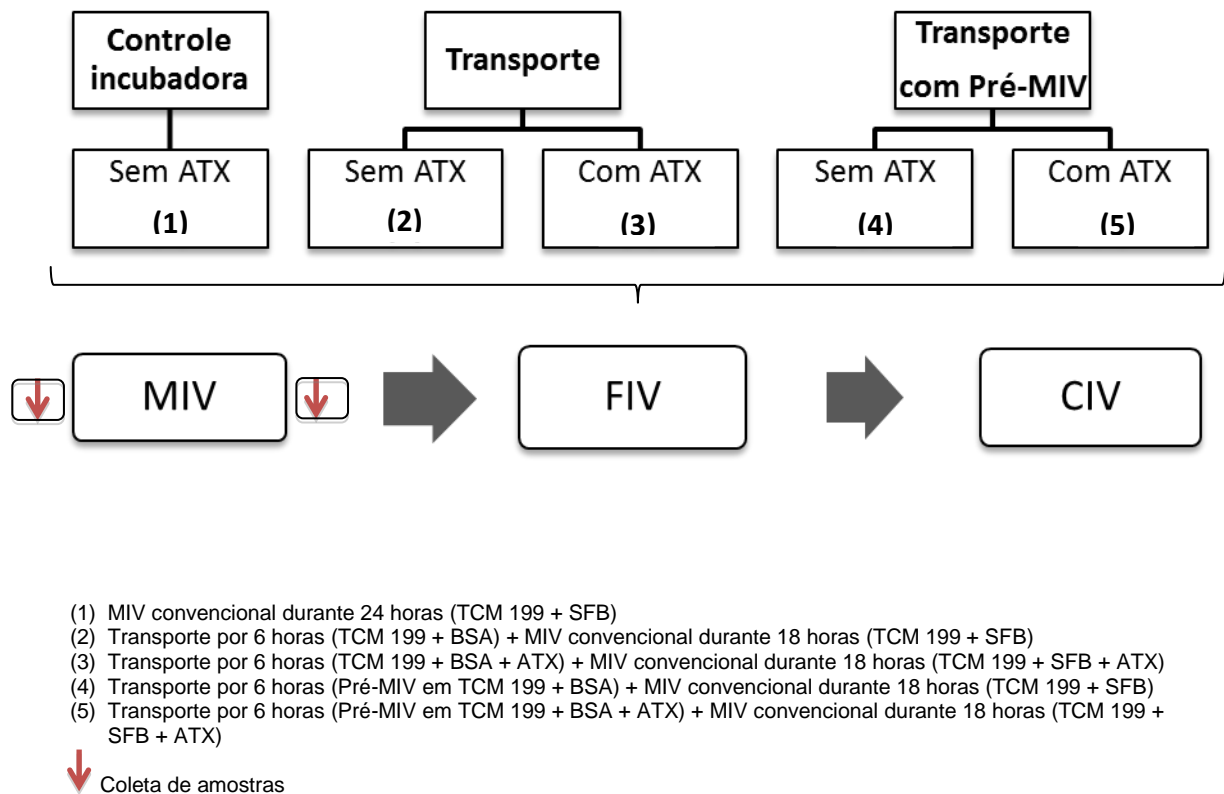


Figura 1. Grupos experimentais propostos para o experimento

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram repetidos no mínimo 3 vezes para cada avaliação proposta, em replicatas independentes. Para as análises em porcentagens (variáveis binomiais: progressão da meiose, reposicionamento das mitocôndrias, taxas de clivagem e de produção de blastocistos e taxa de sobrevivência pós-aquecimento) a unidade experimental para cada replicata foi uma microgota da placa de cultivo celular contendo 25 oócitos. Para as demais análises (concentração intracelular de ROS e PMM), a unidade experimental foi um oócito individual. As taxas de clivagem e de produção de blastocistos foi calculada a partir do número de oócitos inseminados. Os dados foram analisados pela fração de oócitos ou embriões cultivados que atingiram os estágios determinados, reportada em termos de porcentagem.

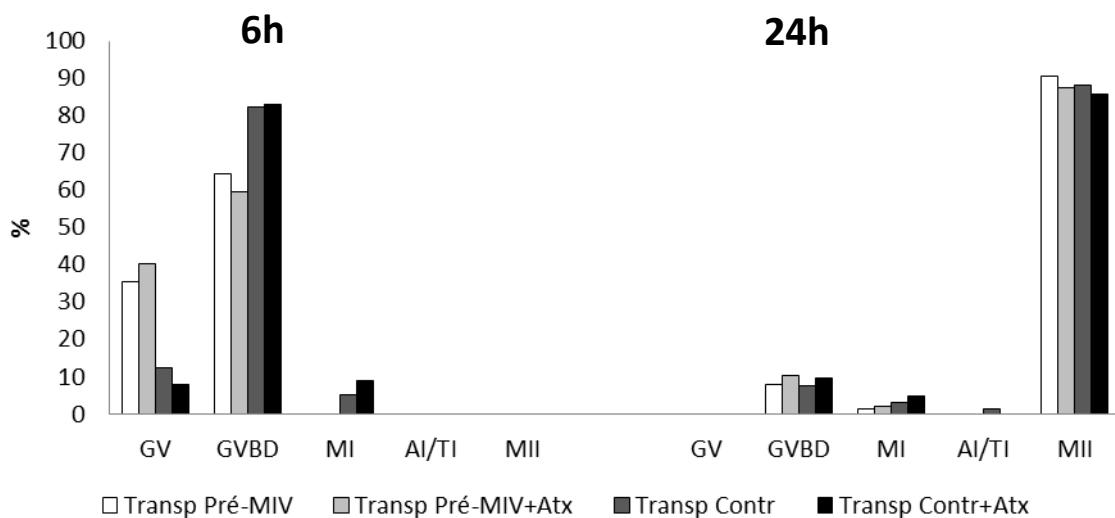
As porcentagens foram transformadas utilizando arco seno raiz quadrada. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), considerando um modelo estatístico que inclui os bloqueadores da meiose como suplemento do meio de cultivo (presença ou ausência de bloqueador), a suplementação com a mistura de antioxidantes (presença ou ausência de antioxidantes) e possíveis interações. As comparações múltiplas das médias foram determinadas pelo teste de Tukey, incluindo-se uma testemunha adicional (grupo Controle incubadora SFB). O estudo comparativo da sobrevivência pós-aquecimento foi avaliado pelo teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ). As análises foram realizadas no programa JMP versão 5.0.1 (SAS Institute) e o nível de significância adotado foi de 5%.

As médias estão apresentadas na forma de médias dos quadrados mínimos (LSM)  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

## RESULTADOS

### Estadio da meiose

As taxas de maturação nuclear após 6 horas de transporte simulado e após 24 horas de MIV estão representadas na Figura 2. Como não houve interação entre o efeito dos bloqueadores da meiose e antioxidantes ( $P > 0,05$ ), os dados estão apresentados separadamente, como variáveis independentes (Tabelas 1 e 2).



**Figura 2.** Maturação nuclear em oócitos submetidos ao transporte simulado na presença ou ausência de bloqueadores da meiose e antioxidantes. Vesícula germinativa (VG); quebra da vesícula germinativa (GVBD); metáfase I (MI); anáfase I/ telófase I (AI/TI); metáfase II (MII). Transp Pré-MIV: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,3% BSA e bloqueadores da meiose (100 µM de forscolina e 500 µM de IBMX); Transp Pré-MIV+Atx: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,3% BSA, bloqueadores da meiose e mistura de antioxidantes (100 µM de cisteamina, 0,6 mM de cisteína e 100 UI catalase); Transp Contr: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA; Transp Contr+Atx: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h, em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e mistura de antioxidantes. Após transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (duração total da MIV = 24h) em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> em ar, em meio MIV suplementado com 10% SFB; oócitos transportados em meio suplementado com mistura de antioxidantes foram maturados em meio MIV suplementado com a mesma mistura.

A análise da comparação das médias dos efeitos principais (efeito dos bloqueadores da meiose e dos antioxidantes) foi feita com a inclusão de uma testemunha adicional (grupo Controle Incubadora SFB: C). A suplementação do meio com antioxidantes (Tabela 1) não afetou ( $P>0,05$ ) a progressão da meiose, avaliada ao término do transporte (GV: 20,0±4,5% a 24,1±6,3%; GVBD: 71,3±4,7% a 77,0±3,9%; MI: 2,5±1,5% a 4,4±2,1%; AI/TI: 0%; e MII: 0%) e ao término da MIV (GV: 0%; GVBD: 7,6±1,2% a 9,9±1,3%; MI: 0% a 3,3±1,5%; AI/TI: 0% a 0,6±0,6%; e MII: 86,6±2,6% a 91,4±1,0%).

**Tabela 1.** Efeitos da suplementação do meio de transporte com antioxidantes (cisteína + cisteamina + catalase) sobre a maturação nuclear de oócitos bovinos destinados à produção *in vitro* de embriões (médias dos quadrados mínimos ± EPM)

Grupo	N	Duração da MIV	% GV (LSM±EPM)	% GVBD (LSM±EPM)	% MI (LSM±EPM)	% AI/TI (LSM±EPM)	% MII (LSM±EPM)
C	88	6h	20,0±4,5	77,0±3,9	2,8±1,7	0	0
T	172		23,9±4,6	73,4±3,6	2,5±1,5	0	0
TA	170		24,1±6,3	71,3±4,7	4,4±2,1	0	0
C	67	24h	0	8,5±1,0	0	0	91,4±1,0
T	125		0	7,6±1,2	2,2±1,0	0,6±0,6	89,5±1,2
TA	135		0	9,9±1,3	3,3±1,5	0	86,6±2,6

Vesícula germinativa (VG); quebra da vesícula germinativa (GVBD); metáfase I (MI); anáfase I/ telófase I (AI/TI); metáfase II (MII). C (controle incubadora): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; T (transporte sem antioxidante): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA; TA (transporte com antioxidante): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e com a mistura de antioxidantes (100 µM de cisteamina, 0,6 mM de cisteína e 100 UI catalase). Após transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (duração total da MIV = 24h) em incubadora com



5% CO<sub>2</sub> em ar, em meio MIV suplementado com 10% SFB; oócitos transportados em meio suplementado com mistura de antioxidantes foram maturados em meio MIV suplementado com a mesma mistura. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos pelo teste de Tukey (P>0,05).

A suplementação do meio com bloqueadores da meiose (Tabela 2) afetou (P<0,05) as taxas de GV, GVBD e MI ao término do transporte. Foram observadas maiores frequências de GV (P<0,05) no grupo TB (37,9±2,0%) em comparação com o grupo T (10,1±1,5%), sendo que ambos estes grupos diferiram (P>0,05) de C (20,0±4,5%). As taxas de GVBD não diferiram (P>0,05) entre os grupos C (77,0±3,9%) e T (82,8±1,1%), no entanto ambos os grupos diferiram (P<0,05) do grupo TB (62,0±2,0%). As taxas de MI dos grupos TB (0%) e C (2,8±1,7%) foram semelhantes (P>0,05), embora o grupo TB tenha diferido (P<0,05) de T (6,9±2,0%). Ao término do transporte nenhum oócito se apresentava em AI/TI (0%) e MII (0%). Após 24 horas de MIV, nenhum oócito se encontrava em GV (0%), sendo que a maior parte deles se encontrava em MII (86,9±2,5% a 91,4±1,0%), não havendo diferença (P>0,05) entre os grupos. Não foram observadas diferenças (P>0,05) entre as taxas de oócitos nas fases de GVDB (8,4±1,5% a 9,1±1,2%), MI (0% a 3,9±1,3%) e AI/TI (0% a 0,6±0,6%) ao término da MIV.

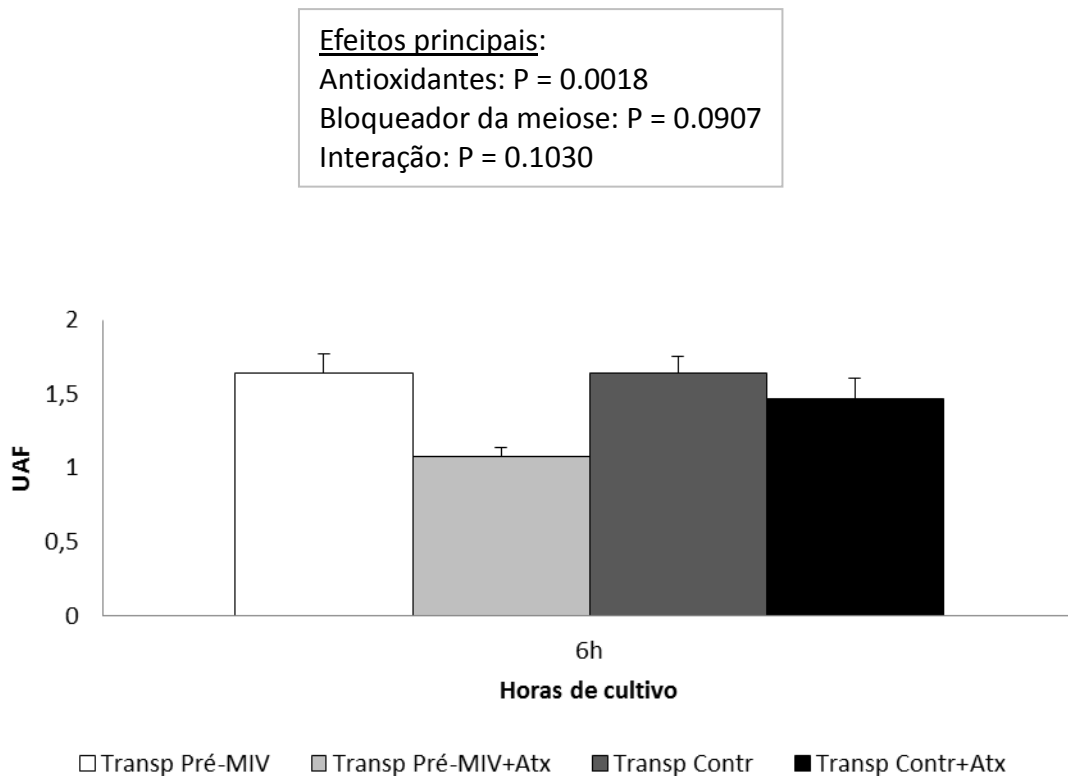
**Tabela 2.** Efeitos da suplementação do meio de transporte com bloqueadores da meiose (forskolina + IBMX) sobre a maturação nuclear de oócitos bovinos destinados à produção *in vitro* de embriões (médias dos quadrados mínimos ± EPM)

Grupo	N	Duração da MIV	% GV (LSM±EPM)	% GVBD (LSM±EPM)	% MI (LSM±EPM)	% AI/TI (LSM±EPM)	% MII (LSM±EPM)
C	88		20,0±4,5 <sup>b</sup>	77,0±3,9 <sup>a</sup>	2,8±1,7 <sup>ab</sup>	0	0
T	172	6h	10,1±1,5 <sup>c</sup>	82,8±1,1 <sup>a</sup>	6,9±2,0 <sup>a</sup>	0	0
TB	170		37,9±2,0 <sup>a</sup>	62,0±2,0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0	0
C	67		0	8,5±1,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	91,4±1,0 <sup>a</sup>
T	125	24h	0	8,4±1,5 <sup>a</sup>	3,9±1,3 <sup>a</sup>	0,6±0,6 <sup>a</sup>	86,9±2,5 <sup>a</sup>
TB	135		0	9,1±1,2 <sup>a</sup>	1,6±1,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	89,1±1,5 <sup>a</sup>

Vesícula germinativa (VG); quebra da vesícula germinativa (GVBD); metáfase I (MI); anáfase I/ telófase I (AI/TI); metáfase II (MII). C (controle incubadora com SFB): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; T (transporte sem bloqueador): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA, sem adição de bloqueadores; TB (transporte com bloqueador): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,3% BSA e bloqueadores da meiose (100 µM forskolina e 500 µM de IBMX). Após transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (duração total da MIV = 24h) em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> em ar, em meio MIV suplementado com 10% SFB; oócitos transportados em meio suplementado com mistura de antioxidantes foram maturados em meio MIV suplementado com a mesma mistura. <sup>ab</sup>Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

### Concentração intracelular de ROS

As concentrações intracelulares de ROS (expressas em UAF) após 6 horas de transporte simulado estão representadas na Figura 3. Como não houve interação entre o efeito dos bloqueadores e dos antioxidantes ( $P > 0,05$ ), os dados estão apresentados separadamente, como variáveis independentes (Tabelas 3 e 4).



**Figura 3.** Concentração intracelular de espécies reativas de oxigênio em oócitos submetidos ao transporte simulado na presença ou ausência de bloqueadores da meiose e antioxidantes. Transp Pré-MIV: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,3% BSA e bloqueadores da meiose (100  $\mu\text{M}$  de forskolina e 500  $\mu\text{M}$  de IBMX); Transp Pré-MIV+Atx: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,3% BSA, bloqueadores da meiose e mistura de antioxidantes (100  $\mu\text{M}$  de cisteamina, 0,6 mM de cisteína e 100 UI catalase); Transp Contr: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA; Transp Contr+Atx: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h, em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e mistura de antioxidantes. Valores expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).

O efeito dos antioxidantes (Tabela 3) resultou em diferença significativa ( $P < 0,05$ ) na contração de ROS em oócitos após 6 horas de transporte, sendo que o maior valor foi observado no grupo T ( $1,5 \pm 0,08$ ), que diferiu ( $P < 0,05$ ) dos grupos C ( $1,0 \pm 0,08$ ) e TA ( $1,1 \pm 0,06$ ).

**Tabela 3.** Concentrações intracelulares de ROS (expressas em unidades arbitrárias de fluorescência) em oócitos cultivados em meio com ou sem antioxidantes (cisteína + cisteamina + catalase) durante transporte simulado por 6 horas

Grupo	N	Unidades arbitrárias de fluorescência (LSM $\pm$ SEM)
C	58	$1,0 \pm 0,08^b$
T	132	$1,5 \pm 0,08^a$
TA	125	$1,1 \pm 0,06^b$

C (controle incubadora): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; T (transporte sem antioxidante): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA; TA (transporte com antioxidante): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e com a mistura de antioxidantes (100  $\mu$ M de cisteamina, 0,6 mM de cisteína e 100 UI catalase). <sup>ab</sup>Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

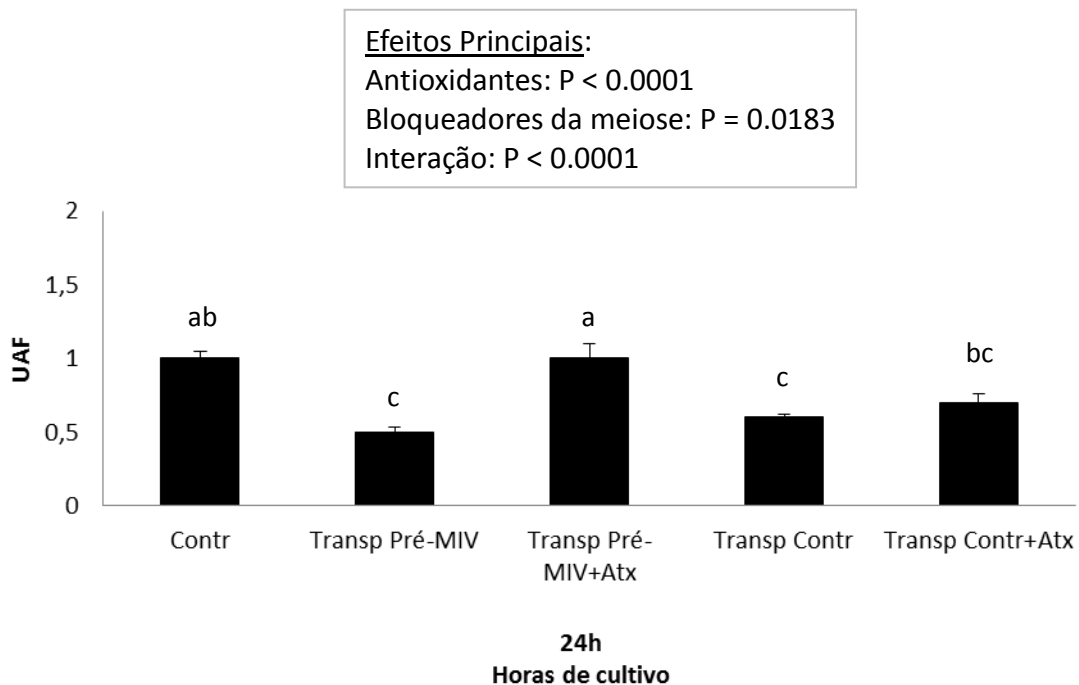
A suplementação com bloqueadores da meiose (Tabela 4) alterou ( $P < 0,05$ ) a concentração de ROS dos oócitos ao término do transporte. Os grupos C ( $1,0 \pm 0,08$ ) e TB ( $1,2 \pm 0,06$ ) apresentaram menores concentrações intracelulares de ROS em comparação com o grupo T ( $1,5 \pm 0,08$ ;  $P < 0,05$ ).

**Tabela 4.** Concentrações intracelulares de ROS (expressas em unidades arbitrárias de fluorescência) em oócitos cultivados em meio com ou sem bloqueadores da meiose (forskolina+IBMX) durante transporte simulado por 6 horas

Grupo	N	Unidades arbitrárias de fluorescência (LSM $\pm$ SEM)
C	58	$1,0 \pm 0,08^b$
T	126	$1,5 \pm 0,08^a$
TB	131	$1,2 \pm 0,06^b$

C (controle): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB por 6h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; T (transporte sem bloqueadores): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% de BSA por 6h em Minitub; TB (transporte com bloqueadores): oócitos maturados *in vitro* meio MIV suplementado com 0,3% de BSA com bloqueadores (100  $\mu$ M de forskolina e 500  $\mu$ M de IBMX) por 6h em Minitub. <sup>ab</sup>Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Foi observada interação ( $P < 0,05$ ) entre o efeito dos antioxidantes e dos bloqueadores ao término da meiose, portanto os dados de todos os grupos estão apresentados na Figura 4. O grupo Transp Pré-MIV+Atx ( $1,0 \pm 0,1$ ) apresentou a maior concentração de ROS, e diferiu ( $P < 0,05$ ) de todos os grupos com exceção de Contr ( $1,0 \pm 0,05$ ). Os grupos Transp Contr ( $0,6 \pm 0,02$ ) e Transp Pré-MIV ( $0,5 \pm 0,03$ ) exibiram as menores concentrações de ROS, diferindo ( $P < 0,05$ ) dos grupos Contr e Transp Pré-MIV+Atx, porém semelhantes ( $P > 0,05$ ) ao grupo Transp Contr+Atx ( $0,7 \pm 0,06$ ).



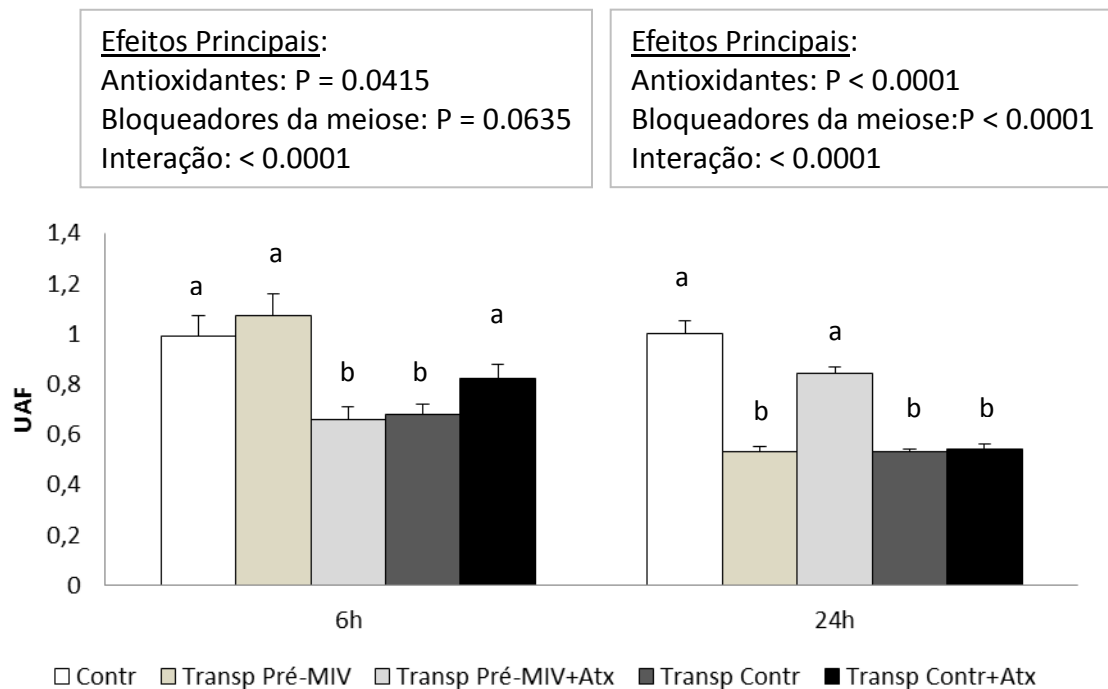
**Figura 4.** Concentração intracelular de espécies reativas de oxigênio em oócitos submetidos ao transporte simulado em meio suplementado na presença ou ausência de bloqueadores da meiose e antioxidantes. Contr: oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB por 6h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; Transp Pré-MIV: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,3% BSA e bloqueadores da meiose (100 μM de forscolina e 500 μM de IBMX); Transp Pré-MIV+Atx: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,3% BSA, bloqueadores da meiose e mistura de antioxidantes (100 μM de cisteamina, 0,6 mM de cisteína e 100 UI catalase); Transp Contr: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA; Transp Contr+Atx: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h, em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e mistura de antioxidantes. Após transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (duração total da MIV = 24h) em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> em ar, em meio

MIV suplementado com 10% SFB; oócitos transportados em meio suplementado com mistura de antioxidantes foram maturados em meio MIV suplementado com a mesma mistura. Valores expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF). <sup>ab</sup>Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

### **Potencial de membrana mitocondrial (PMM)**

Foi observada interação ( $P < 0,05$ ) entre o efeito dos antioxidantes e dos bloqueadores da meiose na análise do PMM em oócitos ao final do transporte simulado e ao término da MIV, portanto os dados de todos os grupos estão apresentados na Figura 5.

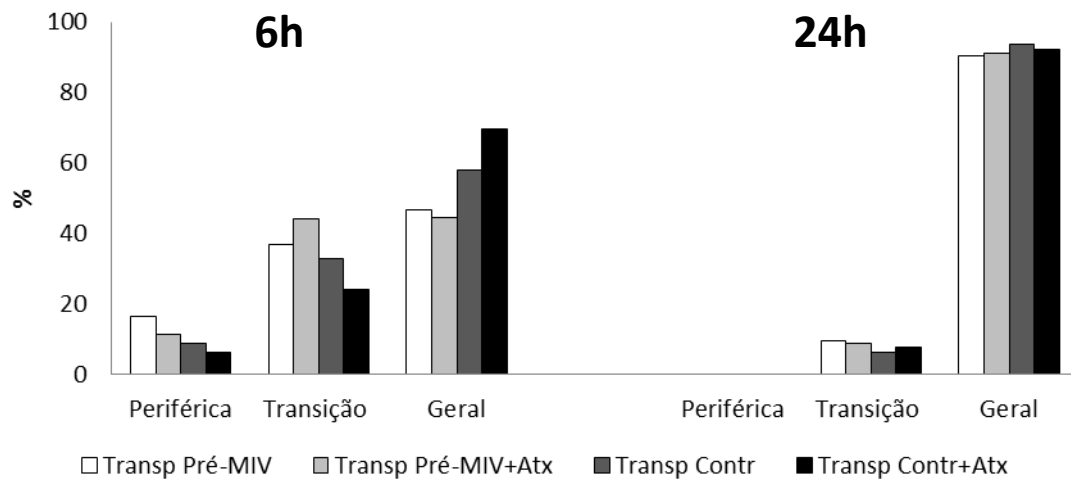
Ao final do transporte, os grupos Transp Pré-MIV ( $1,00 \pm 0,09$ ) e Contr ( $0,9 \pm 0,08$ ) apresentaram o maior PMM, que diferiu ( $P < 0,05$ ) dos grupos Transp Pré-MIV+Atx ( $0,6 \pm 0,05$ ) e Transp Contr ( $0,6 \pm 0,04$ ). Porém, todos estes grupos anteriormente citados foram semelhantes ao grupo Transp Contr+Atx ( $0,8 \pm 0,06$ ). Ao término da MIV, os grupos Contr ( $1,00 \pm 0,05$ ) e Transp Pré-MIV+Atx ( $0,8 \pm 0,04$ ) apresentaram o maior PMM, que diferiram ( $P < 0,05$ ) dos grupos Transp Pré-MIV ( $0,6 \pm 0,04$ ), Transp Contr ( $0,5 \pm 0,02$ ) e Transp Contr+Atx ( $0,5 \pm 0,03$ ).



**Figura 5.** Potencial de membrana mitocondrial de oócitos submetidos ao transporte simulado em meio suplementado com diferentes bloqueadores da meiose e antioxidantes. Contr: oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; Transp Pré-MIV: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,3% BSA e bloqueadores da meiose (100 μM de forskolina e 500 μM de IBMX); Transp Pré-MIV+Atx: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,3% BSA, bloqueadores da meiose e mistura de antioxidantes (100 μM de cisteamina, 0,6 mM de cisteína e 100 UI catalase); Transp Contr: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA; Transp Contr+Atx: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h, em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e mistura de antioxidantes. Após transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (duração total da MIV = 24h) em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> em ar, em meio MIV suplementado com 10% SFB; oócitos transportados em meio suplementado com mistura de antioxidantes foram maturados em meio MIV suplementado com a mesma mistura. Valores expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF). <sup>ab</sup>Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

### Distribuição citoplasmática das mitocôndrias

A distribuição citoplasmática das mitocôndrias após 6 horas de transporte simulado e após 24 horas de MIV está representada na Figura 6. Como não houve interação entre o efeito dos bloqueadores e dos antioxidantes (P>0,05), os dados estão apresentados separadamente, como variáveis independentes (Tabelas 7 e 8).



**Figura 6.** Distribuição citoplasmática das mitocôndrias em oócitos submetidos ao transporte simulado em meio suplementado com diferentes bloqueadores da meiose e antioxidantes. Transp Pré-MIV: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,3% BSA e bloqueadores da meiose (100  $\mu$ M de forskolina e 500  $\mu$ M de IBMX); Transp Pré-MIV+Atx: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,3% BSA, bloqueadores da meiose e mistura de antioxidantes (100  $\mu$ M de cisteamina, 0,6 mM de cisteína e 100 UI catalase); Transp Contr: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA; Transp Contr+Atx: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h, em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e mistura de antioxidantes. Após transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (duração total da MIV = 24h) em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> em ar, em meio MIV suplementado com 10% SFB; oócitos transportados em meio suplementado com mistura de antioxidantes foram maturados em meio MIV suplementado com a mesma mistura.

A suplementação do meio com antioxidantes (Tabela 5) não afetou ( $P>0,05$ ) o reposicionamento citoplasmático das mitocôndrias em oócitos avaliados ao término do transporte, sendo a maior parte das mitocôndrias encontrava-se em fase de transição ( $36,2\pm 6,7\%$  a  $48,8\pm 1,9\%$ ) ou dispersas no citoplasma ( $39,8\pm 5,5\%$  a  $54,4\pm 8,9\%$ ) e, em menor parte, na periferia dos oócitos ( $9,1\pm 2,7\%$  a  $17,2\pm 5,8\%$ ). Após 24 horas de MIV, as mitocôndrias ocupavam a posição predominantemente dispersa no citoplasma dos oócitos ( $90,0\pm 1,3\%$  a  $92,0\pm 1,9\%$ ). Neste momento, não foram encontradas mitocôndrias na periferia dos oócitos e poucas se encontravam em transição ( $7,9\pm 1,9\%$  a  $9,9\pm 1,3\%$ ), sendo que os grupos não diferiram ( $P>0,05$ ) entre si.

**Tabela 5.** Efeitos da suplementação do meio de transporte com antioxidantes (cisteína + cisteamina + catalase) sobre a distribuição citoplasmática das mitocôndrias em oócitos bovinos destinados à produção *in vitro* de embriões (médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM)

Grupo	N	Duração da MIV	% Periférica (LSM $\pm$ SEM)	% Transição (LSM $\pm$ SEM)	% Geral (LSM $\pm$ SEM)
C	89	6h	11,3 $\pm$ 6,8	48,8 $\pm$ 1,9	39,8 $\pm$ 5,5
T	73		17,2 $\pm$ 5,8	37,3 $\pm$ 5,1	45,3 $\pm$ 10,0
TA	140		9,1 $\pm$ 2,7	36,2 $\pm$ 6,7	54,4 $\pm$ 8,9
C	81	24h	0	9,9 $\pm$ 1,3	90,0 $\pm$ 1,3
T	78		0	7,9 $\pm$ 1,9	92,0 $\pm$ 1,9
TA	161		0	8,2 $\pm$ 1,2	91,7 $\pm$ 1,2

C (controle incubadora): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; T (transporte sem antioxidante): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA; TA (transporte com antioxidante): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e com a mistura de antioxidantes (100  $\mu$ M de cisteamina, 0,6 mM de cisteína e 100 UI catalase). Após transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (duração total da MIV = 24h) em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> em ar, em meio MIV suplementado com 10% SFB; oócitos transportados em meio suplementado com mistura de antioxidantes foram maturados em meio MIV suplementado com a mesma mistura. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos pelo teste de Tukey (P>0,05).

Da mesma forma, a suplementação do meio com bloqueadores da meiose (Tabela 6) não afetou (P>0,05) o reposicionamento citoplasmático das mitocôndrias em oócitos avaliados ao término do transporte, sendo que neste momento a maior parte das mitocôndrias encontrava-se em transição (29,3 $\pm$ 5,1% a 48,8 $\pm$ 1,9%) ou estavam dispersas no citoplasma (39,8 $\pm$ 5,5% a 62,7 $\pm$ 7,1%), havendo poucas mitocôndrias na periferia do oócito (7,8 $\pm$ 2,2% a 18,4 $\pm$ 5,6%). Ao término da MIV, a maior parte das mitocôndrias estava distribuída de forma dispersa (90,0 $\pm$ 1,3% a 92,9 $\pm$ 1,3%), havendo poucas em transição (7,0 $\pm$ 1,3% a 9,9 $\pm$ 1,3%) e nenhuma se localizava na periferia do oócito, sendo que os grupos não diferiram (P>0,05) entre si.



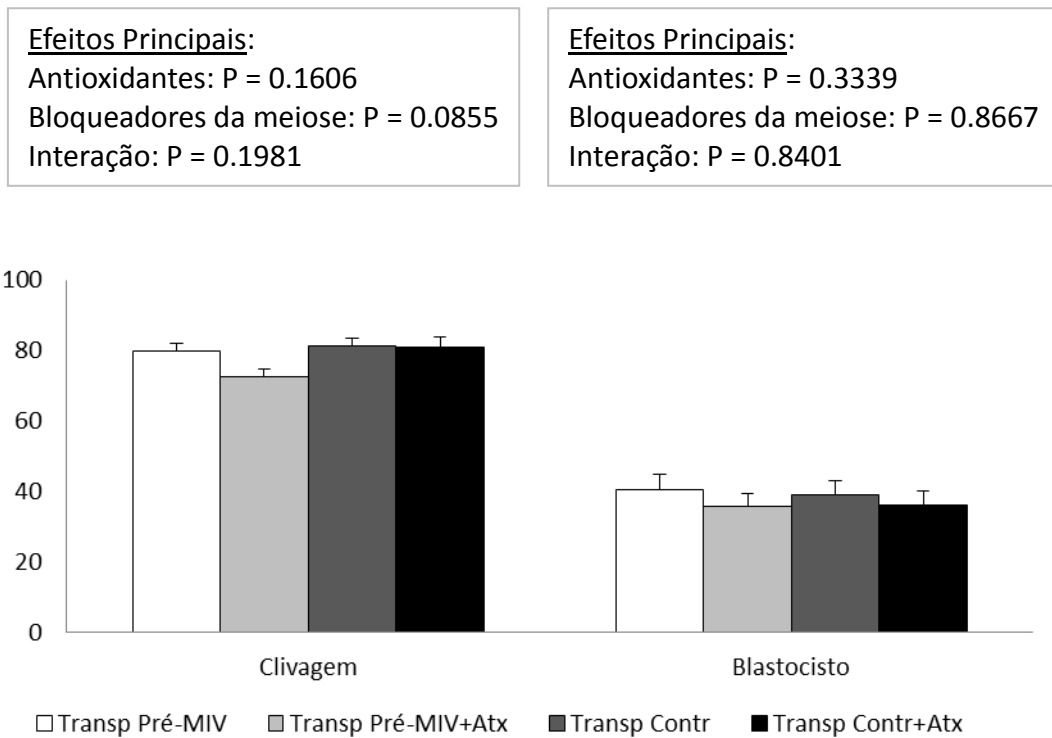
**Tabela 6.** Efeitos da suplementação do meio de transporte com bloqueadores da meiose (forskolina + IBMX) sobre a distribuição citoplasmática das mitocôndrias de oócitos bovinos destinados à produção *in vitro* de embriões (médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM)

Grupo	N	Duração da MIV	% Periférica (LSM $\pm$ SEM)	% Transição (LSM $\pm$ SEM)	% Geral (LSM $\pm$ SEM)
C	89	6h	11,3 $\pm$ 6,8	48,8 $\pm$ 1,9	39,8 $\pm$ 5,5
T	73		7,8 $\pm$ 2,2	29,3 $\pm$ 5,1	62,7 $\pm$ 7,1
TB	140		18,4 $\pm$ 5,6	43,0 $\pm$ 4,6	38,5 $\pm$ 8,6
C	81	24h	0	9,9 $\pm$ 1,3	90,0 $\pm$ 1,3
T	78		0	7,0 $\pm$ 1,3	92,9 $\pm$ 1,3
TB	161		0	9,1 $\pm$ 1,7	90,8 $\pm$ 1,7

C (controle incubadora): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; T (transporte sem bloqueadores): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV com 0,6% de BSA sem suplementação com bloqueadores da meiose; TB (transporte com bloqueadores): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV com 0,3% de BSA suplementado com bloqueadores (100  $\mu$ M de forskolina e 500  $\mu$ M de IBMX). Após transporte, os oócitos foram maturados em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> em ar, em meio MIV suplementado com 10% SFB e mistura de antioxidantes por 18 horas (duração total da MIV = 24h). Não foram observadas diferenças entre os tratamentos pelo teste de Tukey (P>0,05).

### Desenvolvimento embrionário

As taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos para os diferentes tratamentos estão representadas na Figura 7. Como não houve interação entre o efeito da macromolécula e presença de antioxidantes (P>0,05), os dados estão apresentados separadamente, como variáveis independentes (Tabelas 9 e 10).



**Figura 7.** Clivagem e desenvolvimento de embriões produzidos a partir de oócitos bovinos submetidos ao transporte simulado em meio na presença ou ausência de bloqueadores da meiose e antioxidantes. Transp Pré-MIV: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,3% BSA e bloqueadores da meiose (100  $\mu$ M de forscolina e 500  $\mu$ M de IBMX); Transp Pré-MIV+Atx: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,3% BSA, bloqueadores da meiose e mistura de antioxidantes (100  $\mu$ M de cisteamina, 0,6 mM de cisteína e 100 UI catalase); Transp Contr: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA; Transp Contr+Atx: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h, em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e mistura de antioxidantes. Após transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (duração total da MIV = 24h) em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> em ar, em meio MIV suplementado com 10% SFB; oócitos transportados em meio suplementado com mistura de antioxidantes foram maturados em meio MIV suplementado com a mesma mistura.

A suplementação do meio de transporte com antioxidantes (Tabela 7) não afetou ( $P > 0,05$ ) as taxas de clivagem ( $76,8 \pm 2,0\%$  a  $83,4 \pm 2,7\%$ ) e de desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto ( $36,0 \pm 2,6\%$  a  $39,8 \pm 4,5\%$ ).

Da mesma forma, a suplementação do meio de transporte com bloqueadores da meiose (Tabela 8) não afetou ( $P > 0,05$ ) as taxas de clivagem ( $76,3 \pm 1,6\%$  a  $83,4 \pm 2,7\%$ ) e de desenvolvimento embrionário ( $37,6 \pm 2,8\%$  a  $39,8 \pm 4,5\%$ ).

**Tabela 7.** Clivagem e desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* a partir de oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6 horas em meio suplementado antioxidantes (cisteína + cisteamina + catalase) (médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM)

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Clivagem</b> (LSM $\pm$ SEM)	<b>Blastocisto</b> (LSM $\pm$ SEM)
C	223	83,4 $\pm$ 2,7	39,8 $\pm$ 4,5
T	433	80,6 $\pm$ 1,8	39,9 $\pm$ 2,7
TA	459	76,8 $\pm$ 2,0	36,0 $\pm$ 2,6

C (controle incubadora): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; T (transporte sem antioxidante): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV com 0,6% BSA sem suplementação com a mistura de antioxidantes; TA (transporte com antioxidante): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV com 0,6% BSA suplementado com a mistura de antioxidantes (100  $\mu$ M de cisteamina, 0,6 mM de cisteína e 100 UI catalase). Após transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (duração total da MIV = 24h) em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> em ar, em meio MIV suplementado com 10% SFB; oócitos transportados em meio suplementado com mistura de antioxidantes foram maturados em meio MIV suplementado com a mesma mistura. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos pelo teste de Tukey (P>0,05).

**Tabela 8.** Clivagem e desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* a partir de oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6 horas em meio suplementado com bloqueadores da meiose (forskolina + IBMX) (médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM)

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Clivagem</b> LSM $\pm$ SEM	<b>Blastocisto</b> LSM $\pm$ SEM
C	223	83,4 $\pm$ 2,7	39,8 $\pm$ 4,5
T	447	81,0 $\pm$ 2,1	37,6 $\pm$ 2,8
TB	445	76,3 $\pm$ 1,6	38,3 $\pm$ 2,7

C (controle incubadora com SFB): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; T (transporte sem bloqueadores): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA; TB (transporte com bloqueadores): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,3% BSA e 100  $\mu$ M de forskolina e 500  $\mu$ M de IBMX. Após transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (duração total da MIV = 24h) em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> em ar, em meio MIV suplementado com 10% SFB; oócitos transportados em meio suplementado com mistura de antioxidantes foram maturados em meio MIV suplementado com a mesma mistura. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos pelo teste de Tukey (P>0,05).

### **Sobrevivência à criopreservação**

As taxas de re-expansão embrionária após aquecimento e cultivo *in vitro* por 24 horas podem ser visualizadas na Tabela 9. A suplementação do meio de transporte com bloqueadores da meiose e/ou antioxidantes não afetou (P>0,05) a taxa re-expansão embrionária (50% a 71,4%).

**Tabela 9.** Taxas de re-expansão após aquecimento e cultivo *in vitro* por 24 horas de embriões bovinos produzidos *in vitro* a partir de oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6 horas em meio suplementado com bloqueadores da meiose (forskolina + IBMX) e/ou antioxidantes (cisteína + cisteamina + catalase)

Grupos	Embriões desvitrificados (n)	Re-expansão 24 h n (%)
Contr	23	16 (69,5%)
Transp Pré-MIV	18	12 (66,6%)
Transp Pré-MIV+Atx	21	15 (71,4%)
Transp Contr	14	7 (50,0%)
Transp Contr+Atx	16	9 (56,2%)

Contr (controle incubadora): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>. Transp Pré-MIV: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,3% BSA e bloqueadores da meiose (100 µM de forskolina e 500 µM de IBMX); Transp Pré-MIV+Atx: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,3% BSA, bloqueadores da meiose e mistura de antioxidantes (100 µM de cisteamina, 0,6 mM de cisteína e 100 UI catalase); Transp Contr: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA; Transp Contr+Atx: oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h, em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e mistura de antioxidantes. Após transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (duração total da MIV = 24h) em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> em ar, em meio MIV suplementado com 10% SFB; oócitos transportados em meio suplementado com mistura de antioxidantes foram maturados em meio MIV suplementado com a mesma mistura. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos pelo teste do qui-quadrado (P>0,05).

## DISCUSSÃO

A remoção dos oócitos do ambiente inibitório do folículo estimula a retomada espontânea da meiose, o que pode levar à perda da sincronia entre maturação nuclear e citoplasmática, influenciando negativamente na qualidade oocitária (YANG et al., 1998). Além disso, a MIV é geralmente conduzida em atmosfera gasosa superior a presente nas condições *in vivo*, o que pode resultar no aumento da produção de ROS e diminuir a viabilidade dos COCs (THOMPSON et al., 1990; VOELKEL e HU, 1992; CORRÊA et al., 2008). As condições durante o transporte, como meio, temperatura e duração do transporte, também podem diminuir a viabilidade e qualidade dos COCs e influenciar sua capacidade de produzir embriões viáveis. Como estratégia para melhorar a eficiência da PIV, pode-se incorporar ao transporte dos COCs o cultivo de pré-MIV na presença de inibidores da meiose, tais como forskolina e IBMX, visando bloquear a meiose e fornecer tempo adicional para

a capacitação do oócito. Ainda, a suplementação do meio com antioxidantes intra (cisteína e cisteamina) e extracelulares (catalase) pode ser vantajosa na neutralização das ROS. No presente estudo, o sistema de transporte de oócitos em pré-MIV com antioxidantes foi viável, pois o desenvolvimento embrionário foi semelhante entre grupos de oócitos submetidos ao transporte e os grupos maturados por todo período em incubadora a 5% de CO<sub>2</sub>.

Foi descrito anteriormente que o sistema de pré-MIV com moduladores de AMPc atenuou a maturação espontânea do oócito e prolongou a comunicação entre células do cumulus e oócito pelas junções "gap", levando a uma significativa melhora no desenvolvimento embrionário (ALBUZ et al., 2010; ZENG et al., 2013). No presente estudo foi observado que o uso de forskolina e IBMX (moduladores de AMPc) durante o transporte por um período de 6 horas conseguiu manter a meiose parcialmente bloqueada, pois oócitos suplementados com bloqueadores da meiose (TB) apresentaram maior taxa de oócitos em GV quando comparados aos grupos C e TS. A forskolina atua estimulando a síntese de AMPc pela adenilato ciclase, enquanto que o IBMX inibe a fosfodiesterase (PDE) que é responsável por hidrolisar o AMPc (ZENG et al., 2014; LI et al., 2016). Desta forma, possivelmente os moduladores de AMPc utilizados durante a pré-maturação foram eficientes em manter elevados os níveis de AMPc, retardando temporariamente a retomada da meiose e fornecendo tempo adicional para a capacitação oocitária (HUANG et al., 2013; ROSE et al., 2013; LI et al., 2016).

O hormônio luteinizante (LH) é responsável pela expansão das células do *cumulus* devido à produção de ácido hialurônico, com consequente fechamento das junções "gap" que fazem a comunicação entre células do cumulus e oócito, culminando na condensação da cromatina e progressão da meiose. Enquanto que o hormônio folículo estimulante (FSH) atua na indução da maturação (SMITZ, 2011; LI et al., 2013; LUCIANDO & LODDE et al., 2013). Por isso, durante a pré-maturação o meio não foi suplementado com estas gonodotrofinas, de modo a evitar qualquer estímulo para a retomada da meiose.

Já nos oócitos submetidos ao transporte simulado sem bloqueadores, foi evidenciada a aceleração da meiose assim como a maior contração de ROS quando

comparado aos oócitos do grupo controle. As ROS, especificamente o  $H_2O_2$ , atuam na sinalização celular e modulam vários aspectos fisiológicos dos oócitos, incluindo o bloqueio e retomada do ciclo meiótico, sendo que elevadas concentrações de  $H_2O_2$  e baixas de óxido nítrico sinalizam a retomada da meiose em oócitos bovinos (COMBELLES et al., 2009; LOPES et al., 2010). Portanto, de acordo com os resultados encontrados neste estudo, parece que a precoce retomada da meiose neste grupo (TS) pode estar ligada à elevada concentração de ROS.

Após o transporte, a maior parte dos os oócitos em todos os grupos estava em GVBD e pequena proporção dos COCs no estágio de GV, visto que a GVBD se inicia após 6 horas de MIV e é máxima após 8 horas (LI et al., 2005). Depois do transporte, os oócitos foram submetidos à MIV por 18 horas adicionais em meio livre de inibidor. Os oócitos que passaram pela pré-maturação completaram a maturação ao mesmo tempo (24 horas) que os demais grupos (C e TS). Portanto, mesmo após a exposição dos oócitos aos moduladores de AMPc, forskolina e IBMX, os oócitos foram capazes de retomar e concluir a meiose, chegando a MII. Com relação a suplementação com antioxidantes, os grupos transportados com ou sem suplementação de antioxidantes (TA e T respectivamente), apresentaram resultados semelhantes ao controle, após 24h de MIV grande parte dos oócitos atingiram MII.

Foi demonstrado anteriormente que os antioxidantes podem ser eficientes quando as condições de cultivo são inadequadas por si só, não sendo evidenciada sua ação em condições ideais de cultivo (HARVEY et al., 2007). Assim, como sugerido por estes autores (HARVEY et al., 2007), a suplementação com antioxidantes durante o transporte foi eficiente para melhorar as condições do cultivo, já que foi verificada menor concentração intracelular de ROS nestes grupos (TA) quando comparado ao oócitos transportados sem antioxidantes (T). Curiosamente, oócitos transportados sem antioxidantes, e que apresentaram maior concentração de ROS após o transporte, exibiram menor concentração de ROS ao final da MIV. Evidências recentes demonstram que a ocorrência de estresse controlado durante a maturação ou cultivo *in vitro* de embriões pode ser benéfica para que os mesmos ativem mecanismos de sobrevivência e adquiram maior resistência à sobrevivência (THORPE et al., 2013).

Com relação aos grupos tratados com bloqueadores, após 6 horas os oócitos transportados com bloqueadores da meiose (TB) apresentaram menor concentração de ROS quando comparado aos oócitos transportados sem bloqueadores (T), e foram semelhantes ao grupo controle. Possivelmente, o bloqueio temporário da meiose no grupo TB pode ter prolongado a comunicação entre células cumulus-oócito por um período adicional, assim aumentou a transferência e o acúmulo de GSH no oócito e, possivelmente, gerou a maior neutralização das ROS (LI et al., 2016). Todavia, esta hipótese necessita ser comprovada.

Quando avaliada a influência dos bloqueadores e dos antioxidantes e seus efeitos no PMM dos oócitos após 6 horas de transporte, foi encontrado maior PMM nos oócitos dos grupos Transp Pré-MIV e Contr. No grupo controle, o elevado PMM pode ser em virtude das condições ideais de cultivo em incubadora à 5% CO<sub>2</sub>, diferentemente dos demais grupos. Enquanto que no grupo Transp Pré-MIV, o prolongamento da comunicação entre as células do cumulus e o oócito, através da manutenção nos níveis de AMPc, pode ter proporcionado maior transferência de substratos energéticos como piruvato e lactato e, desta forma, possivelmente possa ter favorecido a atividade metabólica da célula (SUTTON-MCDOWALL et al., 2010; ZENG et al., 2014).

Após 24 horas de MIV, houve interação entre os efeitos dos bloqueadores e dos antioxidantes sobre a concentração intracelular de ROS e o potencial de membrana mitocondrial. Os oócitos utilizam oxigênio para produção de energia, por meio da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, desta forma estas organelas são consideradas a maior fonte de ROS (DELEUZE & GOUDET, 2010). Os grupos Transp. Pré-MIV+Atx e Contr apresentaram maior concentração intracelular de ROS, porém nestes grupos também foi verificado um elevado potencial de membrana mitocondrial, o que pode, portanto, ter gerado maior produção de ROS decorrente de uma provável maior atividade metabólica celular. Logo, nos grupos Transp BSA+Atx, Transp BSA e Transp Pré-MIV, onde foram encontradas baixas concentrações de ROS, o menor potencial de membrana mitocondrial encontrado pode ser explicado pela possível menor atividade das mitocôndrias.

Apesar dos efeitos negativos que pode causar quando presente em elevadas concentrações, a produção de ROS pode ser considerada fisiológica em algumas circunstâncias. Conforme Thorpe et al.(2013), pequenos aumentos nos níveis de radicais superóxido, produzidos na mitocôndria, tem um efeito protetor durante o estresse induzido por peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ); em resposta às elevadas concentrações de  $H_2O_2$ , vai ocorrer o aumento na produção de radicais superóxido e, desta forma, ativação do mecanismo de defesa celular contra as ROS. Este mecanismo utiliza pequenas moléculas, como a glutatona e defesas enzimáticas (SOD, catalase, tioredoxinas) para neutralizar as ROS, entretanto o papel da mitocôndria e os mecanismos moleculares envolvidos na remoção do peróxido de hidrogênio não estão completamente elucidados (TEMPLE, 2005; THORPE et al., 2013). No presente estudo, a concentração intracelular de ROS após 24 horas de MIV foi menor do que a encontrada após 6 horas de transporte, em todos os grupos com exceção do grupo controle. Este resultado pode indicar que possivelmente houve a ativação do mecanismo de defesa descrito por Thorpe et al. (2013). Logo, houve possivelmente uma tolerância dos oócitos às ROS.

Em oócitos imaturos, as mitocôndrias estão predominantemente dispostas na periferia do oócito e, ao final da maturação, encontram-se dispersas pelo ooplasma (ADONA et al., 2008; OLIVEIRA e SILVA et al., 2011). Este padrão de distribuição também foi encontrado nos tratamentos empregados, demonstrando o correto reposicionamento das mitocôndrias devido à sua migração para os locais que requerem mais energia na célula.

O uso de inibidores da meiose durante o transporte de oócitos por um período prévio à maturação pode aumentar a competência oocitária para o desenvolvimento embrionário, assim como foi demonstrado que a utilização de antioxidantes durante MIV pode melhorar a viabilidade dos oócitos e a futura produção de embriões *in vitro* (ALBUZ et al., 2010; ORSI e LEESE 2001; RICHANI et al., 2014; ZENG et al., 2014; LI et al., 2016). Por outro lado, de acordo com Miranda et al. (2007) e Silva et al. (2011), o transporte pode diminuir a viabilidade dos oócitos e afetar a produção de embriões. Desta forma, embora o cultivo de pré-MIV com antioxidantes durante o transporte por 6 horas não tenha promovido o aumento da competência para o desenvolvimento embrionário, foi eficiente para



manter a qualidade e competência oocitária, visto que as taxas de clivagem, produção de blastocistos e re-expansão embrionária após os processos de vitrificação e aquecimento dos embriões produzidos *in vitro* à partir de oócitos submetidos previamente ao transporte foi semelhante à produção de embriões à partir de oócitos maturados por todo período em incubadora à 5% CO<sub>2</sub>.

A criopreservação de embriões bovinos é fundamental, pois muitas vezes o número de embriões produzidos é maior que o número de receptoras disponíveis (SANCHES et al., 2013). No entanto os embriões bovinos são sensíveis à criopreservação devido a sua elevada concentração lipídeos (LEÃO et al., 2014). A forskolina além de atuar na sincronização da meiose pode estimular a lipólise, diminuindo o acúmulo lipídico nos oócitos em embriões o que pode influenciar positivamente a criotolerância dos embriões. De acordo com Prates et al. (2013), a forskolina utilizada na suplementação do meio de MIV, não diminuiu concentração lipídica nos oócitos. Todavia quando utilizada como suplementação do meio de CIV, diminuiu a concentração de lipídeos dos embriões produzidos *in vitro* (SANCHES et al., 2013). No presente estudo a forskolina utilizada na suplementação do meio de transporte teve efeito positivo no bloqueio da meiose, mas possivelmente não interferiu na concentração de lipídeos dos oócitos e conseqüentemente dos embriões, pois a criotolerância avaliada pela re-expansão dos blastocistos, foi semelhante entre todos os grupos.

## CONCLUSÃO

O cultivo de pré-maturação com os inibidores da meiose forskolina e IBMX foi eficiente em retardar a retomada da meiose e pode ser utilizado para otimizar o período de transporte, visto que a produção *in vitro* de embriões à partir de oócitos pré-maturados sem gonadotrofinas foi semelhante à do grupo controle maturado em meio com gonadotrofinas, em incubadora à 5% de CO<sub>2</sub> por todo o período de MIV . Os antioxidantes cisteína, cisteamina e catalase foram eficientes apenas durante o transporte, quando as condições de cultivo se mostraram sub-ótimas. O transporte de oócitos bovinos em meio suplementado com bloqueadores da meiose e/ou

antioxidantes, pelo período de 6 horas, não afetou a produção embriões *in vitro* assim como a criotolerância dos mesmos.

## REFERÊNCIAS

- ADONA, P. R.; PIRES, P. R. L.; QUETGLAS, M. D.; SCHWARZ, K. R. L.; LEAL, C. L. V. Nuclear maturation kinetics and *in vitro* embryo development of cattle oocytes prematured with butyrolactone I combined or not combined with roscovitine. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 389-397, 2008.
- ALBUZ F. K.; SASSEVILLE M.; LANE M.; ARMSTRONG D. T.; THOMPSON J. G.; GILCHRIST R. B. Simulated physiological oocytematuration (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Hum. Reprod.**, v. 25, p.2999–3011, 2010.
- 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.
- BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artefacts. **Hum. Reprod.**, v.1, p.91-148, 1995.
- COMBELLES M.H.C.;GUPTA S.; AGARWAL A. Could oxidative stress influence the *in-vitro* maturation of oocytes? **Reproductive BioMedicine Online**, v.18, p.864-880, 2009.
- CORRÊA, G.A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T.C.D.; FRANCO, M.M; DODE, M.A.N. Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Animal Reprod Scien.**, v.104, p.132-142, 2008.
- CURNOW EC, RYAN JP, SAUNDERS DM, HAYES ES. Developmental potential of bovine oocytes following IVM in the presence of glutathione ethyl ester. **Reprod Fertil Dev**,v.22,p.597–605, 2010.
- DE MATOS D. G.; FURNUS C. C.; MOSES D. F. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. **Biol Reprod**, v.57, p.1420–1425, 1997.
- DE MATOS D. G.; GASPARRINI B.; PASQUALINI S. R.; THOMPSON J. G. Effect of glutathionesynthesis stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. **Theriogenology**, v.57, p.1443–1451, 2002.
- DELEUZE, S.; GOUDET, G. Cysteamine supplementation of of *in vitro* maturation media: a review. **Reprod. Dom. Anim.**, v.45, p.476-482, 2010.
- FUNAHASHI, H. AND DAY, B.N. Advances in *in vitro* production of porcine embryos. **J. Reprod. Fertil.**, v. 52,p. 271-283, 1997.
- FRANCIOSI F.; COTICCHIO G.; LODDE V.; TESSARO I.; MODINA S. C.; FADINI R.; DAL CANTO M.; RENZINI M. M.; ALBERTINI D. F.; LUCIANO A. M. Natriuretic

peptide precursor C delays meiotic resumption and sustains gap junction-mediated communication in bovine cumulus-enclosed oocytes. **Biol Reprod** v.91, p.61, 2014.

GILCHRIST R. B.; THOMPSON J. G. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v. 67, p.6–15, 2007.

GILCHRIST R. B. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. **Reprod Fertil Dev**, v.23, p.23-31, 2011.

GUIXUE Z.; LUCIANO A. M.; COENEN K.; GANDOLFI F.; SIRARD M. A. The influence of cAMP before or during bovine oocyte maturation on embryonic developmental competence. **Theriogenology**, v.55, p.1733–1743, 2001.

HARVEY A. J. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. **Anim. Reprod. Sci.**, v.98, p.113-128, 2007.

HUANG W.; NAGANO M.; KANG S.; YANAGAWA Y.; TAKAHASHI Y. Effects of in vitro growth culture duration and prematuration culture on maturational and developmental competences of bovine oocytes derived from early antral follicles. **Theriogenology**, V. 80, P. 793–799, 2013.

HYTTEL P.; XU K. P.; SMITH S.; GREVE T. Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. **J. Reprod. Fertil.**, v. 78, p. 615–625, 1986.

LEÃO B. C. S.; ROCHA-FRIGONI N. A. S.; CABRAL E. C.; FRANCO M. F.; FERREIRA C. R.; EBERLIN M. N.; et al. Membrane lipid profile monitored by massspectrometry detected differences between fresh and vitrified in vitro-produced bovine embryos. **Zygote**, 2014, available on CJO2014. <http://dx.doi.org/10.1017/S0967199414000380>.

LI, G. P.; LIU, Y.; BUNCH, T. D.; WHITE, K. L.; ASTON, K. I. Asymmetric division of spindle microtubules and microfilaments during bovine meiosis from metaphase I to metaphase II. **Molecular Reproduction and Development**. v. 71, p. 220-226, 2005.

LI H. W.; LEE V. C.; LAU E. Y.; YEUNG W. S.; HO P. C.; NG E. H. Cumulative taxa de nascidos vivos em mulheres com síndrome do ovário policístico ou ovários policísticos isolados submetidos *in vitro* tratamento de fertilização. **J Assist Reprod Genet**, v.14, p. 14, 2013.

LI H. J.; SUTTON-MCDOWALL M. L.; WANG X.; SUGIMURA S.; THOMPSON J. G.; GILCHRIST R. B. Extending prematuration with Camp modulators enhances the cumulus contribution to oocyte antioxidant defence and oocyte quality via gap junctions. **Human Reproduction**, v.31, p. 810–821, 2016.

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

LONERGAN P. State-of-the-art embryo technologies in cattle. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, v.64, p.315–325, 2007.

LONERGAN P.; FAIR T. Maturation of Oocytes in Vitro. *Rev. Anim. Biosci.* V. 4, P.255-268, 2016.

LOPES A.S., LANE M. AND THOMPSON J.G.. Oxygen consumption and ROS production are increased at the time of fertilization and cell cleavage in bovine zygotes. *Human Reproduction*, v.25,n.11, p. 2762–2773, 2010.

LUCIANO A. M. & LODDE V. Changes of large-scale chromatin configuration during mammalian oocyte differentiation. *Oogenesis*, p. 93-108, 2013

LUCIANO A. M.; POCAR P.; MILANESI E.; MODINA S.; RIEGER D.; LAURIA A.; GANDOLFI F. Effect of different levels of intracellular cAMP on the in vitro maturation of cattle oocytes and their subsequent development following in vitro fertilization. *Mol Reprod Dev.*, v.54, p.86–91, 1999.

LUCIANO A. M.; FRANCIOSI F.; MODINA S. C.; LODDE V. Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP-dependent mechanism(s). *Biol Reprod.*, v.85, p.1252-1259, 2011.

MASTROIANNI L. J. R. & JONES R. Oxygen tension within the rabbit fallopian tube. *J Reprod Fertil*, v.9, p.99- 102, 1965.

MIRANDA, M.S.; CARVALHO, C.M.F; CORDEIRO, M.S.; SANTOS, S.S.D.; OHASHI, O.M. Sistemas alternativos de incubação e meios de cultivo para produção in vitro de embrião bovino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, n.2, p.218-223, 2007.

OLIVEIRA E SILVA, I.; VASCONCELOS, R. B.; CAETANO, J. V. O.; GULART, L. V. M.; CAMARGO, L. S. A.; BÃO, S. N.; ROSA E SILVA, A. A. M. Induction of reversible meiosis arrest of bovine oocytes using a two-step procedure under defined and nondefined conditions. *Theriogenology*. v. 75, p. 1115-1124, 2011.

ORSI, N.M; LEESE, H.J. Protection against reactive oxygen species during mouse preimplantation embryo development: role of EDTA, oxygen tension, catalase, superoxide dismutase and pyruvate. *Mol. Reprod. Develop.*, v. 59, p.44-53, 2001.

PARRISH J. J.; SUSKO-PARRISH J.; WINER M. A.; FIRST N. L. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* v.38, p.1171–88, 1988.

PRATES E. G.; ALVES S. P.; MARQUES C. C.; BAPTISTA M. C.; HORTA A. E.; BESSA R. J.; et al. Fatty acid composition of porcine cumulus oocyte complexes (COC) during maturation: effect of the lipid modulators trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (t10,c12 CLA) and forskolin. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.*v.49, p.335–45, 2013.

RATY M.; KETOJA E.; PITKANEN T.; AHOLA V.; KANANEN K.; PEIPPO J. In vitro maturation supplements affect developmental competence of bovine cumulus-oocyte complexes and embryo quality after vitrification. **Cryobiology**, v.63, p.245-255, 2011.

ROCHA-FRIGONI N. A. S.; LEÃO B. C. S.; NOGUEIRA E.; ACCORSI M. F.; MINGOTI G. Z. Effects of gaseous atmosphere and antioxidants on the development and cryotolerance of bovine embryos at different periods of *in vitro* culture. **Zygote**, v. ,p., 2013.

ROCHA-FRIGONI N. A. S.; LEÃO B. C.; NOGUEIRA É.; ACCORSI M. F.; MINGOTI G. Z. Reduced levels of intracellular reactive oxygen species and apoptotic status are not correlated with increases in cryotolerance of bovine embryos produced *in vitro* in the presence of antioxidants. **Reprod Fertil Dev**, v.26, p.797-805, 2014.

ROSE R. D.; GILCHRIST R. B.; KELLY J. M.; THOMPSON J. G.; SUTTON-MCDOWALL M. L. Regulation of sheep oocyte maturation using cAMP modulators. **Theriogenology** , v.79, P. 142–148, 2013.

RICHANI D.; WANG X.; ZENG H. T.; SMITZ J.; THOMPSON J. G.; GILCHRIST R. B. Pre-maturation with cAMP modulators in conjunction with EGF-like peptides during in vitro maturation enhances mouse oocyte developmental competence. **Mol Reprod Dev.**, v.81, p.422–435, 2014.

SANCHES B. V.; MARINHO L. S. R.; FILHO B. D. O.; PONTES J. H. F.; BASSO A. C., MEIRINHOS M. L. G.; SILVA-SANTOS K. C.; FERREIRA C. R.; SENEDA M. M. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. **Theriogenology**, v. 80, p. 372–377, 2013.

SHU Y. M.; ZENG H. T.; REN Z.; ZHUANG G. L.; LIANG X. Y.; SHENHW YAO S. Z.; KE P. Q.; WANG N. N. Effects of cilostamide and forskolin on the meiotic resumption and embryonic development of immature human oocytes. **Hum Reprod.**,v.23, p.504–513, 2008.

SILVA L. K.; REIS A. N.; SILVA A. O. A.; SOUSA J. S.; SOUZA A. J. O.; VALE W. G. Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação por diferentes períodos de tempo sem controle da atmosfera gasosa. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.63, p.74-80, 2011.

SMITZ JE, THOMPSON JG, GILCHRIST RB. The promise of in vitro maturation in assisted reproduction and fertility preservation. **Semin Reprod Med**, v.29, p.24–37, 2011.

SUTTON-MCDOWALL M.; GILCHRIST R.; THOMPSON J. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. **Reproduction**, v. 139, p.685-695, 2010.

TAKAHASHI, M.; NAGAI, T.; OKAMURA, N.; TAKAHASHI, H.; OKANO, A. Promoting effect of beta-mercaptoethanol on *in vitro* development under oxidativestress and cystine uptake of bovine embryos. **Biol. Reprod.**, v.66, p.562-569, 2002.

TAKEO T, HORIKOSHI Y, NAKAO S, SAKOH K, ISHIZUKA Y, TSUTSUMI A, FUKUMOTO K, KONDO T, HARUGUCHI Y, TAKESHITA Y et al. Cysteine analogs with a free thiol group promote fertilization by reducing disulfide bonds in the zona pellucida of mice. **Biol Reprod**, v.4, p.92-90, 2015.

TEMPLE MD, PERRONE GG, DAWES IW. Complex cellular responses to reactive oxygen species. **Trends Cell Biol**, v.15, p. 319–326, 2005.

THOMPSON, J.G.E.; SIMPON. A.C.; PUGH, P.A; DONNELLY, P.E.; TERVIT, H.R. Effect of oxygen concentration on *in vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. **J. Reprod. Fertil.**, v.89, p.573-578, 1990.

THORPE G. W., REODICA M., DAVIES M. J.; HEEREN G.; JAROLIM S., PILLAYA B., BREITENBACHD M., HIGGINS V. J.; DAWESA I. W. Superoxide radicals have a protective role during H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. **Molecular Biology of the Cell** 2876-2884, 2013.

THOMAS R. E.; ARMSTRONG D. T.; GILCHRIST R. B. Bovine Cumulus Cell-Oocyte Gap Junctional Communication During In Vitro Maturation in Response to Manipulation of Cell-Specific Cyclic Adenosine 3',5'- Monophosphate Levels. **Biology of Reproduction**, v.70, p.548–556 2004.

VAJTA G.; RINDOM N.; PEURA T.T.; HOLM P.; GREVE T.; CALLESEN H. The effect of media, serum, and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after open pulled straw (OPS) vitrification. **Theriogenology**, v.52, p.939–948, 1999.

VAN DEN HURK R. & ZHAO J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717–1751, 2005.

VOELKEL, S.A.; HU, Y.V.; MOORE, K.; BONDIOLI, K.R. Freeze survival of bovine embryos produced by *in vitro* maturation, fertilization and culture of oocytes. **Theriogenology**, v.37, p. 317 (abstr), 1992.

WATSON A. J.; WATSON P. H.; ARCELLANA-PANLILIO M.; WARNES D.; WALKER S. K.; SCHULTZ G. A.; ARMSTRONG D. T.; SEAMARK R. F. A growth factor phenotype map for ovine preimplantation development **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 725-731, 1994.

WOLF, A. **Estímulo da síntese de glutatona na maturação *in vitro* de oócitos bovinos e sua influência no desenvolvimento embrionário**. 2005. 101f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal)- Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

YANG H. W.; HWANG K. J.; KWON H. C.; KIM H. S.; CHOI K. W.; OH K. S. A detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e apoptose em embriões fragmentated humanos . **Hum Reprod** ., v.13, p.998-1002, 1998.

ZENG H. T.; REN Z.; GUZMAN L.; WANG X.; SUTTON-MCDOWALL M. L.; RITTER L. J.; DE VOS M.; SMITZ J.; THOMPSON J. G.; GILCHRIST R. B. Heparin and cAMP modulators interact during pre-in vitro maturation to affect mouse and human

oocyte meiosis and developmental competence. **Hum Reprod.**, v.28, p.1536–1545, 2013.

ZENG H. T.;, RICHANI D.; SUTTON-MCDOWALL M. L.; REN Z.; SMITZ J. E. J.; STOKES Y.; GILCHRIST R. B.; THOMPSON J. G. Prematuration with Cyclic Adenosine Monophosphate Modulators Alters Cumulus Cell and Oocyte Metabolism and Enhances Developmental Competence of In Vitro- Matured Mouse Oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 91, p. 1–11, 2014.



### **CAPÍTULO 3 – TRANSPORTE DE OÓCITOS BOVINOS EM MEIO SUPLEMENTADO COM DIFERENTES FONTES DE MACROMOLÉCULAS E ANTIOXIDANTES: EFEITOS SOBRE A MATURAÇÃO NUCLEAR E CITOPLASMÁTICA E SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO *IN VITRO***

**RESUMO-** O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da suplementação do meio com SFB e BSA, do tratamento com antioxidantes durante o transporte de oócitos bovinos por 6 horas sobre: 1) progressão da maturação nuclear; 2) maturação citoplasmática e 3) competência no desenvolvimento e criotolerância dos embriões produzidos. Para tanto, o meio de transporte de oócitos foi suplementado com macromoléculas (SFB ou BSA), e os antioxidantes cisteína, cisteamina e catalase. Os oócitos foram incubados em incubadora portátil (Minitub®) para simulação de transporte. Posteriormente, foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV) em incubadora à 5% de CO<sub>2</sub> em ar até completar 24h e, em seguida, foram fecundados e os prováveis zigotos foram cultivados *in vitro* durante 7 dias. Foram feitos dois grupos controle: MIV com 10% de SFB (Controle); MIV com 10% de SFB e os antioxidantes cisteína, cisteamina e catalase (Controle com antioxidantes), por 24h. Foram avaliados a cinética da maturação nuclear e maturação citoplasmática (pelos seguintes parâmetros: avaliação do posicionamento de mitocôndrias, do potencial de membrana mitocondrial e do conteúdo intracelular de espécies reativas do oxigênio) após o transporte e após a MIV. Foram feitas a avaliação da taxa de clivagem (48 hpi), do desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos (168 hpi), e taxa de re-expansão após 24 horas de re-cultivo. A taxa de oócitos em GVBD foi maior ( $P < 0,05$ ) no grupo Transporte SFB (86,8%) e menor no grupo Controle (77,0%), ambos os grupos foram semelhantes ao Transporte BSA (82,8%). Com relação à concentração de ROS, nos oócitos tratados com antioxidantes após 6 horas as concentrações de ROS foram maior ( $P < 0,05$ ) no grupo Transporte sem antioxidantes (1,6) e menor nos grupos Controle (1,0), Controle com antioxidantes (1,1) e Transporte com antioxidantes (1,2) e após a MIV foi maior ( $P < 0,05$ ) no grupo Controle (1,0). Com relação ao PMM, após 6 horas de transporte houve interação entre os tratamentos (macromoléculas+antioxidantes), o grupo Controle (1,0) apresentou maior ( $P < 0,05$ ) PMM, mas foi semelhante ( $P > 0,05$ ) ao grupo Transporte SFB (0,8) e Transporte BSA com antioxidantes (0,8), nos grupos Controle com antioxidantes (0,6) e Transp SFB com antioxidantes (0,6) foi observado menor PMM, porém estes grupos foram semelhantes ( $P > 0,05$ ) ao Transporte BSA (0,6) e Transporte BSA com antioxidantes. Após 24 horas não foi verificada interação entre os tratamentos, nos oócitos tratados com antioxidantes, o grupo Controle (1,0) mostrou maior ( $P < 0,05$ ) PMM, os grupos Transporte sem antioxidantes (0,4) e Transporte com antioxidantes (0,5) apresentaram menor PMM e o grupo Controle com antioxidantes (0,8) diferiu ( $P < 0,05$ ) de todos os grupos experimentais. A suplementação do meio com SFB ou BSA, e antioxidantes no meio de transporte por 6 horas, não interferiu na produção e criotolerância dos embriões.

**Palavras-chave:** Transporte, oócitos bovino, antioxidantes, macromoléculas, maturação *in vitro*

## TRANSPORT OF BOVINE OOCYTES IN MEDIUM SUPPLEMENTED WITH MACROMOLECULES DIFFERENT SOURCES AND ANTIOXIDANTS: EFFECTS ON NUCLEAR AND CYTOPLASMIC MATURATION AND ON EMBRYONIC DEVELOPMENT *IN VITRO*

**Abstract-** The objective of this study was to evaluate the effects of the medium supplemented with FCS and BSA, treatment with antioxidants during transport of bovine oocytes for 6 hours on: 1) progression of nuclear maturation; 2) cytoplasmic maturation and 3) competence in the development and cryotolerance of embryos produced. Therefore, the means of transport of oocytes was supplemented with macromolecules (FCS or BSA), and antioxidants cysteine, cysteamine and catalase. Oocytes were incubated in a portable incubator (Minitub®) for transport simulation for 6h. They were posteriorly submitted *in vitro* maturation (IVM) in incubator in 5% CO<sub>2</sub> in air to complete 24 hours and then were fertilized and presumptive zygotes were cultured *in vitro* for 7 days. Two control groups were made: IVM with 10% FCS for 24 hours (Control); IVM with 10% FCS and antioxidants (cysteine, cysteamine and catalase) for 24 h (Control+Atx). We evaluated the kinetics of nuclear maturation and cytoplasmic maturation (made by: the following parameters: evaluation of positioning of mitochondria, the mitochondrial membrane potential and intracellular content of reactive oxygen species) after transport and after IVM. They were made to evaluate the rate of cleavage (48 hpi) and embryo development to the blastocyst stage (168 hpi), and the rate of re-expansion after 24 hours of re-cultivation. The GVBD oocyte rate was higher ( $P < 0.05$ ) in the Transport FCS group (86.8%) and lowest in Control FCS (77.0%), both groups were similar Transport BSA (82.8%). With respect to the concentration of ROS in oocytes treated with antioxidants after 6 hours ROS concentration was higher ( $P < 0.05$ ) in Transport (1.6) group and lower in Control (1,0) Control with Antioxidants (1,1) and Transport with Antioxidants (1.2) groups and after IVM was higher in Control (1.0) group. Regarding MMP, after 6 hours of transport was no interaction between treatments (macromolecules+antioxidants), Control group (1.0) were higher ( $P < 0.05$ ) MMP, but was similar ( $P > 0.05$ ) Transport the FCS group (0.8) and Transport BSA + Atx (0.8), in Control + Atx (0.6) and Transport FCS + Atx (0.6) groups were lower MMP observed, but these groups were similar ( $P > 0.05$ ) the Transport BSA (0.6) and Transport BSA + Atx. After 24 hours was not verified interaction between treatments in oocytes treated with antioxidants, the Control (1.0) group demonstrate higher ( $P < 0.05$ ) MMP, Transport (0.4) and Transport with Antioxidants (0.5) groups had a lower MMP and Control with Antioxidants group (0, 8) differed ( $P < 0.05$ ) of all experimental groups. Supplementation of the medium with FCS or BSA, and antioxidants in the transport medium for 6 hours did not affect the production and cryotolerance embryos.

**Keywords:** Transport, bovine oocyte, antioxidants, macromolecules, *in vitro* maturation

## INTRODUÇÃO

A utilização de biotecnologias reprodutivas, juntamente com a seleção genética do rebanho, é a melhor estratégia para aumentar rapidamente a produtividade na pecuária. O aprimoramento da produção *in vitro* (PIV) na última década e sua eficácia tem sido relatada em diversos estudos, por isso aumentou sua aplicação em escala comercial (BONI, 2012; PONTES et al., 2009; MOROTTI et al., 2014; PELLEGRINO et al., 2016). Entretanto, a eficiência da PIV ainda é considerada baixa, pois apenas 30% dos oócitos cultivados chegam ao estágio de blastocisto.

Os embriões produzidos *in vivo* apresentam maior qualidade e viabilidade do que aqueles produzidos por maturação, fertilização e cultivo *in vitro* (LONERGAN et al., 2007; ULLOA et al., 2008 PONTES et al., 2009). A qualidade e a maturação do oócito estão entre as possíveis causas das diferenças entre produção *in vitro* e *in vivo* e estes são os principais fatores que merecem atenção para a que se possa aumentar a eficiência da PIV (DEMYDA-PEYRÁS et al., 2013). A composição do meio utilizado na MIV tem grande impacto na qualidade do oócito e na sua competência para a fertilização (DEMYDA-PEYRÁS et al., 2013). Comumente utiliza-se suplementação proteica de origem animal nos meios de MIV e, entre as macromoléculas utilizadas como suplemento, o soro fetal bovino (SFB) proporciona maiores taxas de produção de embriões em sistemas de PIV. O SFB contém substâncias benéficas como fatores de crescimento, quelantes de metais pesado e componentes que ajudam na expansão das células do *cumulus* (ABE and HOSHI 2003). No entanto, este composto proteico tem o potencial o transmitir diversos patógenos e alterar a expressão de vários genes. Além disso, a absorção de lipídeos pelos oócitos bovinos maturados *in vitro* na presença de SFB é muito elevada, o que pode prejudicar a qualidade oocitária e também a qualidade e criticidade dos embriões (KIM et al., 2001; ABE et al., 1999 e RIZOS et al., 2003). Em função do excessivo do acúmulo intracelular de lipídeos, há conseqüentemente o aumento da sensibilidade ao estresse oxidativo e à criopreservação (PEREIRA et al., 2008; AL DARWICH et al., 2011).

Como alternativa para a substituição do SFB, pode-se utilizar a albumina sérica bovina (BSA) para suplementação do meio de MIV, sendo que esta é um composto proteico semi-definido livre de ácidos graxos. Todavia, os resultados obtidos através da utilização de BSA na PIV são controversos, pois existem relatos de que a BSA retarda a maturação nuclear, diminui a expansão das células do *cumulus* e reduz a produção de embriões em comparação ao SFB (DEL COLLADO et al., 2015). Entretanto, Russel et al. (2006) não demonstraram haver diferenças na maturação nuclear e nas taxas de blastocistos quando comparou BSA e SFB como suplementos dos meios de MIV.

O acúmulo lipídico em excesso na célula é um fator limitante para o desenvolvimento e criotolerância do embrião PIV. Entretanto, em concentrações fisiológicas, os lipídeos são essenciais para o metabolismo energético da célula. A energia, em forma de ATP, é gerada pela  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos nas mitocôndrias. Sob condições fisiológicas, a  $\beta$ -oxidação nas mitocôndrias é a principal fonte de ROS nos oócitos e embriões. As ROS são formadas durante as etapas intermediárias da redução da molécula de oxigênio e estão envolvidas em diversos processos relacionados com a fisiologia ovariana, incluindo a maturação oocitária (ISHIKAWA, 1993; SABATINI et al., 1999; BEHRMAN et al., 2001). Em condições fisiológicas há um equilíbrio entre a produção de ROS e os mecanismos endógenos antioxidantes. No entanto, em sistemas *in vitro* pode ocorrer a elevação na concentração de ROS devido às condições inerentes ao sistema, tais como exposição à luz, tensão de O<sub>2</sub>, cátions metálicos e também em decorrência de fatores endógenos, como maior atividade mitocondrial (NARS-ESFAHANI, 1990; & NARSESFAHANI & JOHNSON, 1991; GOTO et al., 1993; NODA 1992; GUÉRIN et al., 2001; DELEUZE & GOUDET, 2010).

A presença de ROS em excesso nos oócitos implica no desbalanço entre ROS e as defesas endógenas antioxidantes, gerando o denominado estresse oxidativo. Este estresse é prejudicial à célula, pois pode gerar injúrias como a peroxidação lipídica, danos mitocondriais, oxidação de aminoácidos e ácidos nucleicos, culminando em apoptose (HALIWELL & GUTTERIDGE, 1992; JOHNSON & NARS ESFAHANI 1994; ALI et al., 2003; KITAGAWA et al., 2004). Para proteger

oócitos e embriões contra o estresse oxidativo durante a PIV, tem sido sugerido a adição de antioxidantes aos meios de cultivo. Os antioxidantes, por definição, são qualquer substância que, quando presentes em baixas concentrações comparado ao substrato oxidável, atrasa significativamente ou inibe a oxidação deste substrato (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Os antioxidantes podem ser dos tipos enzimáticos ou não enzimáticos, além de possuírem mecanismos de ação distintos e atuarem dentro ou fora da célula. A catalase é um antioxidante enzimático extracelular que atua na redução do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água e oxigênio molecular, e sua adição ao meio de cultivo teoricamente tende a ser benéfica, muito embora diversos trabalhos não tenham demonstrado sua eficácia (LI et al., 1993; BILODEAU et al., 2003).

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo tiol de baixo peso molecular e é o principal componente sulfidril não proteico presente nas células, atuando como principal antioxidante não enzimático na eliminação das ROS. A concentração deste antioxidante ao final da maturação é considerada como um bom marcador bioquímico da viabilidade do oócito. A GSH é formada pelos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina, sendo que sua síntese é limitada pela presença da L-cisteína no meio extracelular (DELEUZE & GOUDET, 2010). Entretanto, a cisteína é um aminoácido muito instável fora da célula e é auto-oxidada em cistina, impedindo a sua captação. A cisteamina é um componente tiol de baixo peso molecular que reduz a cistina em cisteína e promove a captação deste aminoácido pelas células, aumentando assim a síntese de GSH. Conseqüentemente, a cisteamina pode ser considerada um fator determinante no mecanismo de defesa contra ROS (MERTON et al., 2013). Em diversos trabalhos tem sido relatado o efeito benéfico da adição de cisteína e cisteamina ao meio de MIV sobre a produção de embriões (ALI et al., 2003; BALASUBRAMANIAN et al., 2007; MERTON et al., 2013).

O transporte do local de coleta até o laboratório é considerado como fator limitante para a PIV comercial, pois as condições como temperatura, composição do meio e duração do transporte podem influenciar na competência oocitária e em sua capacidade de produzir embriões viáveis (SILVA et al., 2011). O meio utilizado durante transporte é um dos principais fatores que interferem na PIV (GARCIA et al., 1998), por isso a escolha da macromolécula a ser utilizada no meio de transporte-

maturação, assim como a adição de antioxidantes, pode ter influência benéfica sobre os oócitos e a PIV, pois podem fornecer condições mais adequadas de maturação, mesmo durante o transporte.

Assim sendo, o presente estudo tem como objetivo realizar o transporte de oócitos bovinos em meio suplementado com diferentes macromoléculas (SFB ou BSA) e antioxidantes de ação intra- (cisteína e cisteamina) e extra-celular (catalase), e avaliar seus efeitos sobre a maturação nuclear e citoplasmática, bem como sobre o subsequente desenvolvimento embrionário e criotolerância dos embriões. Diante do exposto, foi proposto a busca de alternativas que preservem ao máximo a viabilidade do oócito durante o transporte destes do local de coleta até o laboratório de PIV.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Reagentes químicos**

Os reagentes químicos utilizados foram adquiridos da empresa Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), caso contrário estão especificados no texto. Materiais plásticos e tubos foram obtidos da empresa Corning Inc. (Acton, MA, USA).

### **Obtenção e seleção de oócitos**

Os ovários de bovinos abatidos nos frigoríficos da região de Araçatuba-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 3 horas desde o abate até o início das aspirações. As punções foliculares foram realizadas manualmente, com auxílio de agulha de calibre 18-G adaptada a seringa de 10 ml, ambas descartáveis, sendo que foram aspirados apenas os folículos com diâmetro entre 3 a 8 mm. Todo o material aspirado foi transferido para tubos plásticos de 50 ml, os quais ficaram em repouso (decantação) por 15 minutos para posterior seleção dos oócitos. O sedimento foi transferido para placas de poliestireno de 60 mm de diâmetro e avaliado em microscópio estereoscópico. Os oócitos foram selecionados em fluido folicular puro,

o qual foi obtido do sobrenadante dos tubos de aspiração, em cada réplica do experimento; o fluido foi centrifugado à 12500 x *g* por 5 minutos, em seguida o sobrenadante foi recuperado e acrescido 75µl/ml de penicilina/estreptomicina. Apenas oócitos com *cumulus* compacto (complexos *cumulus*-oócito - COCs), contendo pelo menos quatro camadas de células e de aparência saudável (citoplasma de granulação homogênea) foram selecionados para os experimentos. Os COCs selecionados foram lavados duas vezes em fluido folicular e duas vezes em meio TCM-199 (suplementado com 0,2 mM de piruvato, 75 µg de amicacina e 0,3% BSA). Posteriormente, foram destinados aos procedimentos subsequentes.

### **Simulação do transporte**

Os oócitos selecionados foram submetidos à simulação de transporte anteriormente ao cultivo de maturação *in vitro*. Os COCs foram acondicionados em criotubos (25 COCs/criotubo) contendo 500 µl de meio composto por: 1) meio de maturação B-199 (TCM-199 suplementado com 0,2 mM de piruvato, 25 mM de bicarbonato de sódio, 75 µg de amicacina, 1 µg de 17-β estradiol/ml, 0,5 µg de FSH/ml e 100 UI de hCG/ml) acrescido de 10% de SFB; ou 2) meio de maturação B-199 acrescido de 0,6% de BSA. Ainda, os meios descritos receberam ou não a suplementação de uma mistura de antioxidantes, conforme preconizado por Rocha-Frigoni (2014) [100 µM de cisteamina associada a 0,6 mM de seu precursor, a cisteína (DELEUZE & GOUDET, 2010; ALI et al., 2003) e 100 UI catalase (ORSI & LEESE, 2001)]. O meio foi coberto com 400 µl óleo mineral e os criotubos foram gaseificados com mistura gasosa contendo 5% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub> em balanço. A seguir, foram acondicionados em incubadora portátil (Minitub) à 38,5°C durante 6 horas.

### **Maturação *in vitro***

Após a simulação de transporte, os oócitos foram transferidos para microgotas de 100 µl de meio de maturação B-199 suplementado com 10% de SFB, recobertas com óleo mineral. O meio de maturação dos oócitos que foram submetidos ao transporte simulado na presença da mistura de antioxidantes também

recebeu suplementação com a mistura (0,6 mM cisteína + 100 µM cisteamina + 100 UI catalase); o meio de MIV dos demais oócitos não foi suplementado com a mistura. O cultivo de maturação foi conduzido em incubadora (Thermo Forma) com temperatura de 38,5°C, máxima umidade e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar, por mais 18 horas. Desta forma, o tempo total de cultivo de maturação foi de 24 horas (6 horas em transporte simulado em incubadora portátil e mais 18 horas em incubadora de CO<sub>2</sub>).

Oócitos do grupo controle (Controle Incubadora SFB) foram maturados em microgotas de 100 µl de meio de maturação B-199 suplementado com 10% de SFB, recobertas com óleo mineral, em incubadora com temperatura de 38,5°C, máxima umidade e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar, por 24 horas. Enquanto que os oócitos do grupo controle com antioxidantes (Controle Incubadora SFB + Atx) foram maturados em microgotas de 100 µl de meio de maturação B-199 suplementado com 10% de SFB e a mistura de antioxidantes (0,6 mM cisteína + 100 µM cisteamina + 100 UI catalase), recobertas com óleo mineral, em incubadora com temperatura de 38,5°C, máxima umidade e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar, por 24 horas.

A descrição dos grupos experimentais pode ser melhor visualizada no item *Delineamento Experimental*.

### **Avaliação da maturação nuclear**

Os oócitos foram desnudados por sucessivas pipetagens em solução de hialuronidase 0,2% em PBS, acrescida de 1% PVP. Posteriormente, foram fixados em paraformaldeído 4% por 10 minutos e foram permeabilizados em solução de Triton X-100 0,5% em citrato de sódio 0,1% por 5 minutos. Em seguida, foram corados com 1 µg/mL de Hoechst 33342 por 15 minutos, no escuro, em temperatura ambiente. Posteriormente, foram avaliados em microscópio invertido equipado com epifluorescência (Olympus, IX51; excitação 404 nm e emissão 526 nm) para determinação do estadio da meiose. Os oócitos foram classificados em imaturos (configuração nuclear em vesícula germinativa - VG), maduros (metáfase II - MII) e em estadios intermediários (Int.) da meiose (quebra da vesícula germinativa - GVBD, metáfase I - MI, anáfase I – AI ou telófase I - TI).



### **Avaliação da distribuição citoplasmática das mitocôndrias e do potencial de membrana mitocondrial**

Para avaliação da distribuição citoplasmática das mitocôndrias e do potencial de membrana mitocondrial (PMM), os oócitos foram desnudados e corados com a sonda fluorescente MitoTracker Red® (CMXROs, Molecular Probes, Invitrogen, Oregon, USA), de acordo com as informações do fabricante. Os oócitos foram incubados no escuro por 30 minutos em PBS com 1% de PVP acrescido de 500 nM de MitoTracker Red® CMXROs, em temperatura de 37°C. Posteriormente, foram lavados três vezes em PBS e avaliados imediatamente em microscópio invertido equipado com epifluorescência (Olympus, IX51), sob excitação de 543 nm e emissão de 575 nm. As imagens obtidas foram armazenadas e, após conversão para escala de cinza, foram analisadas com auxílio do software Q-Capture Pro Image (Media Cybernetics, Inc., Versão 5.0.1.26) para quantificação da intensidade de fluorescência emitida, mensurada em pixels. A intensidade do sinal de “background” foi subtraída dos valores medidos das imagens. Um grupo experimental foi escolhido como calibrador (grupo Controle Incubadora SFB) e o valor de cada imagem foi dividido pela média do calibrador para gerar os níveis de expressão relativa de fluorescência (unidades arbitrárias de fluorescência - UAF). Quanto maior a intensidade de fluorescência, maior o PMM. Os oócitos foram também classificados de acordo com a distribuição citoplasmática de mitocôndrias (distribuição periférica: oócitos imaturos; distribuição dispersa: oócitos maduros; transição: oócitos parcialmente maduros).

### **Mensuração do conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio pelo ensaio com diclorofluoresceína**

Os níveis intracelulares de ROS ( $H_2O_2$ ,  $HO\cdot$ ,  $ROO\cdot$ ) foram quantificados através da utilização da sonda fluorescente diacetato de 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína ( $H_2DCFDA$ ; Molecular Probes, Invitrogen). Resumidamente, os oócitos foram lavados duas vezes em PBS e incubados em 5

$\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  durante 30 minutos no escuro,  $38^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$  em ar. Os oócitos foram então lavados duas vezes em PBS e analisados imediatamente em microscópio invertido, sob excitação de 495 nm e emissão de 520 nm. As imagens obtidas foram armazenadas e, após conversão para escala de cinza, foram analisadas com auxílio do software Q-Capture Pro Image para quantificação da intensidade de fluorescência emitida, mensurada em pixels. A intensidade do sinal de “background” foi subtraída dos valores medidos das imagens. O grupo Controle Incubadora SFB foi escolhido como calibrador e o valor de cada imagem foi dividido pela média do calibrador para gerar os níveis de expressão relativa de fluorescência (expressos em UAF).

### **Fertilização *in vitro***

Foi utilizado o sêmen de um único touro e da mesma partida. A palheta de sêmen foi descongelada à temperatura de  $36^\circ\text{C}$  por 40 segundos e os espermatozoides vivos foram obtidos por centrifugação em gradiente de densidade descontínua (45 e 90%) de Percoll durante 7 minutos a  $2500\times g$  em temperatura ambiente. O sedimento recuperado foi avaliado quanto ao volume, concentração e motilidade espermática. A concentração final foi ajustada para  $25\times 10^6$  de espermatozoides vivos por ml de meio fecundação (TALP-FIV; PARRISH *et al.*, 1988) suplementado com 40  $\mu\text{l/ml}$  solução de PHE (1 mM de hipotaurina, 2 mM de penicilamina e 250 mM de epinefrina) e 10  $\mu\text{g/ml}$  de heparina. Aproximadamente  $100\times 10^3$  espermatozóides foram adicionados a cada gota de 100  $\mu\text{l}$  de meio TALP-FIV designado para cada grupo experimental. Os COCs foram lavados duas vezes em meio TCM-199 HEPES, suplementado com 0,5% de BSA livre de ácidos graxos, e uma vez em meio TALP-FIV. Foram adicionados 25 COCs por microgota de FIV, sendo estes co-incubados a  $38,5^\circ\text{C}$ , por 18 horas, em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  em ar.

### **Cultivo embrionário *in vitro***

O cultivo embrionário foi realizado em microgotas contendo 100  $\mu\text{l}$  de meio SOF (VAJTA *et al.*, 1999) suplementado com 0,5% de BSA e 2,5% de SFB,

recobertas com óleo mineral e mantidas em temperatura de 38,5°C, atmosfera 5% de CO<sub>2</sub> em ar, por até 7 dias.

Após 72 horas do cultivo, 50% do meio de cultivo foi renovado. A clivagem foi avaliada 48 horas pós-inseminação (hpi), e o desenvolvimento embrionário foi avaliado 144 e 168 hpi.

### **Vitrificação e aquecimento dos embriões**

Os procedimentos utilizados para vitrificação e aquecimento foram realizados de acordo com o protocolo Vitri-Ingá® (Ingámed, Paraná, Brasil), sendo os meios e hastes adquiridos desta empresa.

Os blastocistos expandidos obtidos no dia 7 do CIV e classificados em grau 1 e 2, de acordo com o Manual da IETS (WRIGHT, 2009), foram selecionados para vitrificação. Os embriões foram lavados duas vezes em solução de manutenção sem crioprotetores (“Holding”) antes de serem transferidos para a solução VI-I de vitrificação, durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente, foram transferidos para solução VI-II, durante 60 segundos em temperatura ambiente. Os embriões foram então depositados na porção final da haste de vitrificação com o mínimo volume de meio. Os protetores das hastes foram colocados horizontalmente no vapor de nitrogênio (N<sub>2</sub>) líquido por alguns minutos antes de iniciar o procedimento, para então serem mergulhados verticalmente de modo a ficarem totalmente submersos. Finalmente, as hastes contendo os embriões foram introduzidas no protetor, sendo então armazenadas em botijões criogênicos até o momento do uso nas etapas posteriores.

Para aquecimento dos embriões, as hastes foram retiradas do N<sub>2</sub> e a extremidade contendo os embriões foi imersa em solução DV-I de desvitrificação durante 1 minuto, a 37°C, até que a microgota fosse desfeita. Em seguida, os embriões foram transferidos para a solução DV-II por 3 minutos em temperatura ambiente e, finalmente, para a solução DV-III por 10 minutos em temperatura ambiente. Por fim, foram lavados duas vezes em solução de lavagem em temperatura ambiente e cultivados em meio SOFaa por 24 horas em atmosfera de

5% CO<sub>2</sub> em ar. Ao final do período, foram avaliadas as taxas de re-expansão embrionária (sobrevivência *in vitro*).

## DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os COCs selecionados foram divididos em 6 grupos experimentais, conforme descrito a seguir e como mostrado na Figura 1:

- (1) **Controle Incubadora (Contr)**: Os oócitos foram maturados em meio B-199 suplementado com 10% SFB por 24 horas em incubadora de bancada (Thermo Forma).
- (2) **Controle Incubadora Atx (Contr+Atx)**: Os oócitos foram maturados em meio B-199 suplementado com 10% SFB e mistura de antioxidantes (Atx: 100 µM de cisteamina, 0,6 mM de cisteína e 100 UI catalase) por 24 horas em incubadora de bancada.
- (3) **Transporte BSA (Transp BSA)**: COCs foram submetidos à simulação de transporte, em meio B-199 suplementado com 0,6% BSA por 6 horas em incubadora portátil (Minitub). A seguir, foram maturados em meio B-199 suplementado com 10% SFB por 18 horas em incubadora de bancada.
- (4) **Transporte BSA Atx (Transp BSA+Atx)**: COCs foram submetidos à simulação de transporte, em meio B-199 suplementado com 0,6% BSA e mistura de antioxidantes por 6 horas em incubadora portátil (Minitub). A seguir, foram maturados em meio B-199 suplementado com 10% SFB e mistura de antioxidantes por 18 horas em incubadora de bancada.
- (5) **Transporte SFB (Transp SFB)**: COCs foram submetidos à simulação de transporte, em meio B-199 suplementado com 10% SFB por 6 horas em incubadora portátil (Minitub). A seguir, foram maturados em meio B-199 suplementado com 10% SFB por 18 horas em incubadora de bancada.
- (6) **Transporte SFB Atx (Tranp SFB+Atx)**: COCs foram submetidos à simulação de transporte, em meio B-199 suplementado com 10% SFB e mistura de antioxidantes por 6 horas em incubadora portátil (Minitub). A seguir, foram maturados em meio B-199 suplementado com 10% SFB e mistura de antioxidantes por 18 horas em incubadora de bancada.

Uma parte dos oócitos foi avaliada ao final do transporte simulado (6 horas) e após o cultivo de MIV (24 horas de cultivo: transporte + MIV) pela coloração com Hoechst 33342 para determinação do momento final de conclusão da maturação (MII). A maturação citoplasmática foi avaliada pela quantificação do conteúdo intracelular de ROS (coloração com H<sub>2</sub>DCFDA) e pelo reposicionamento das mitocôndrias e potencial de membrana mitocondrial (coloração com MitoTracker Red<sup>®</sup>).

O restante dos oócitos foi submetido à fecundação *in vitro* e foi avaliado o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos. Os embriões produzidos foram vitrificados e a criotolerância destes foi avaliada após o aquecimento e cultivo por 24 horas.

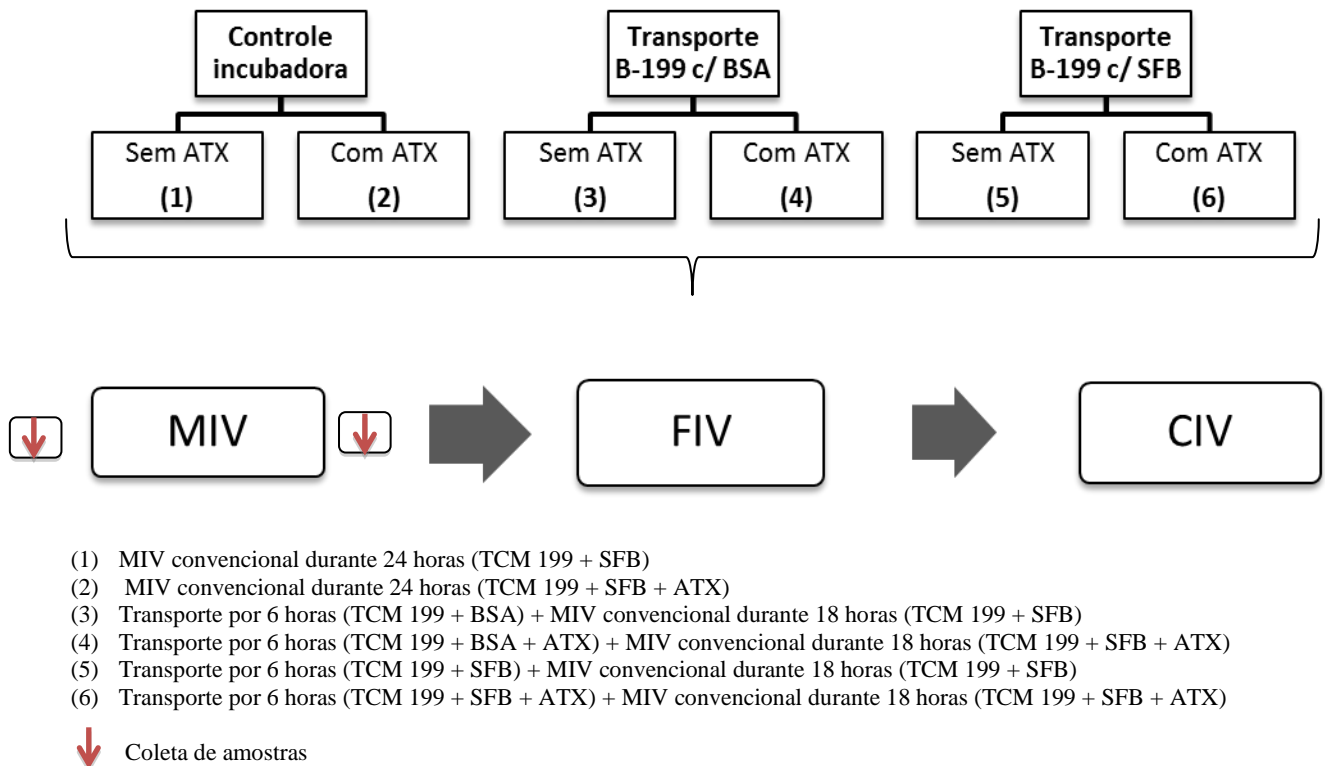


Figura 1. Grupos experimentais propostos para o experimento.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram repetidos no mínimo 3 vezes para cada avaliação proposta, em replicatas independentes. Para as análises em porcentagens (variáveis binomiais: progressão da meiose, reposicionamento das mitocôndrias, taxas de clivagem e de produção de blastocistos e taxa de sobrevivência pós-aquecimento) a unidade experimental para cada replicata foi uma microgota da placa de cultivo celular contendo 25 oócitos. Para as demais análises (concentração intracelular de ROS e PMM), a unidade experimental foi um oócito individual. As taxas de clivagem e de produção de blastocistos foi calculada a partir do número de oócitos inseminados. Os dados foram analisados pela fração de oócitos ou embriões cultivados que atingiram os estágios determinados, reportada em termos de porcentagem.

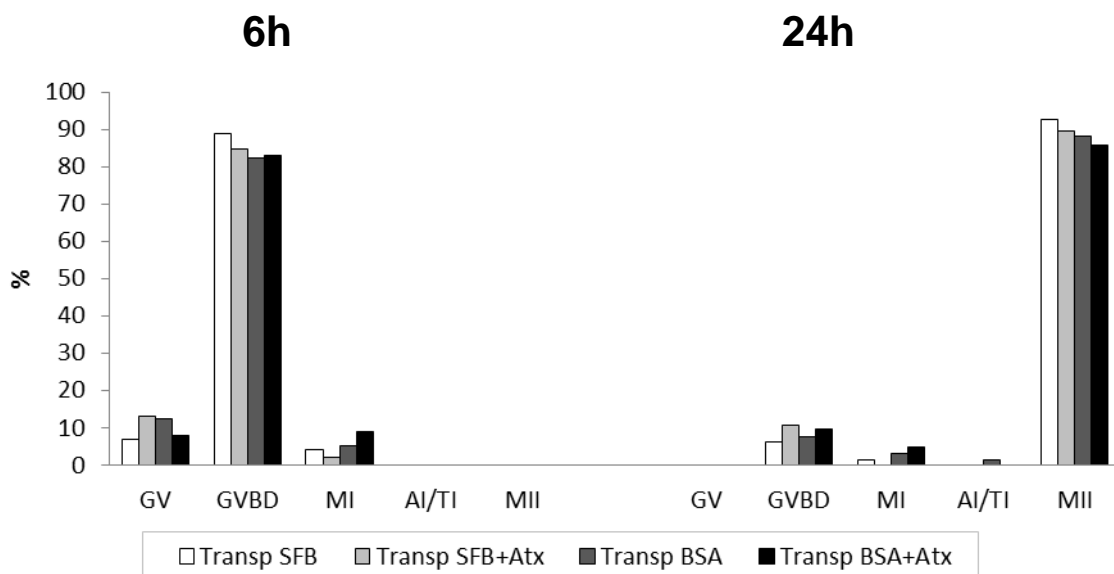
As porcentagens foram transformadas utilizando arco seno raiz quadrada. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), considerando um modelo estatístico fatorial 2x2 que inclui a macromolécula utilizada como suplemento do meio de cultivo (SFB ou BSA), a suplementação com a mistura de antioxidantes (presença ou ausência de antioxidantes) e possíveis interações. As comparações múltiplas das médias foram determinadas pelo teste de Tukey, incluindo-se duas testemunhas adicionais (grupo Controle incubadora SFB e grupo Controle incubadora SFB + Atx). O estudo comparativo da sobrevivência pós-aquecimento foi avaliado pelo teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ). As análises foram realizadas no programa JMP versão 5.0.1 (SAS) Institute e o nível de significância adotado foi de 5%.

As médias estão apresentadas na forma de médias dos quadrados mínimos (LSM)  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

## RESULTADOS

### Estádio da meiose

As taxas de maturação nuclear após 6 horas de transporte simulado e após 24 horas de MIV estão representadas na Figura 2. Como não houve interação entre o efeito da macromolécula e antioxidantes ( $P>0,05$ ), os dados estão apresentados separadamente, como variáveis independentes (Tabelas 1 e 2).



**Figura 2.** Maturação nuclear em oócitos submetidos ao transporte simulado suplementado com diferentes macromoléculas e na presença ou ausência de antioxidantes. Vesícula germinativa (VG); quebra da vesícula germinativa (GVBD); metáfase I (MI); anáfase I/ telófase I (AI/TI); metáfase II (MII). Transp SFB (transporte com SFB): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 10% SFB por 6h; Transp SFB+Atx (transporte com SFB e antioxidante): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 10% SFB e mistura de antioxidantes (100  $\mu$ M de cisteamina, 0,6 mM de cisteína e 100 UI catalase); Transp BSA (transporte com BSA): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA; Transp BSA+Atx (transporte com BSA e antioxidante): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h, em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e mistura de antioxidantes. Após transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (duração total da MIV = 24h) em incubadora com 5%  $\text{CO}_2$  em ar, em meio MIV suplementado com 10% SFB; oócitos transportados em meio suplementado com mistura de antioxidantes foram maturados em meio MIV suplementado com a mesma mistura.

A análise da comparação das médias dos efeitos principais (efeito das macromoléculas e dos antioxidantes) foi feita com a inclusão de uma ou duas testemunhas adicionais, respectivamente para o efeito das macromoléculas e dos

antioxidantes. A suplementação do meio com macromoléculas (Tabela 1) não resultou em diferença significativa ( $P>0,05$ ) sobre as taxas de GV ( $9,9\pm 2,4\%$  a  $20,0\pm 4,5\%$ ), MI ( $2,8\pm 1,7\%$  a  $6,9\pm 2,0\%$ ), AI/TI (0%) e MII (0%) após 6 horas de transporte simulado; as taxas de GVBD não diferiram ( $P>0,05$ ) entre os grupos TS ( $86,8\pm 2,4\%$ ) e TB ( $82,8\pm 1,1\%$ ), embora o grupo TS tenha diferido ( $P<0,05$ ) do grupo controle ( $77,0\pm 3,9\%$ ). Após 24 horas de MIV, nenhum oócito se encontrava em GV (0%), sendo que a maior parte deles se encontrava em MII ( $86,9\pm 2,5\%$  a  $91,4\pm 1,0\%$ ), não havendo diferença ( $P>0,05$ ) entre os grupos. Não foram observadas diferenças ( $P>0,05$ ) entre as taxas de oócitos nas fases de GVDB ( $8,3\pm 2,2\%$  a  $8,5\pm 1,0\%$ ), MI (0 a  $3,9\pm 1,3\%$ ) e AI/TI (0 a  $0,6\pm 0,6\%$ ) ao término da MIV.

**Tabela 1.** Efeitos de diferentes macromoléculas (soro fetal bovino ou albumina sérica bovina) utilizadas como suplemento do meio de transporte sobre a maturação nuclear de oócitos bovinos destinados à produção *in vitro* de embriões (médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM)

Grupo	N	Duração da MIV	% GV (LSM $\pm$ EPM)	% GVBD (LSM $\pm$ EPM)	% MI (LSM $\pm$ EPM)	% AI/TI (LSM $\pm$ EPM)	% MII (LSM $\pm$ EPM)
CS	88		$20,0\pm 4,5^a$	$77,0\pm 3,9^b$	$2,8\pm 1,7^a$	0	0
TS	172	6h	$9,9\pm 2,4^a$	$86,8\pm 2,4^a$	$3,1\pm 1,6^a$	0	0
TB	170		$10,1\pm 1,5^a$	$82,8\pm 1,5^{ab}$	$6,9\pm 2,0^a$	0	0
CS	67		0	$8,5\pm 1,0^a$	$0^a$	$0^a$	$91,4\pm 1,0^a$
TS	125	24h	0	$8,3\pm 2,4^a$	$0,6\pm 0,6^a$	$0^a$	$90,9\pm 2,3^a$
TB	135		0	$8,4\pm 1,5^a$	$3,9\pm 1,3^a$	$0,6\pm 0,6^a$	$86,9\pm 2,5^a$

Vesícula germinativa (VG); quebra da vesícula germinativa (GVBD); metáfase I (MI); anáfase I/ telófase I (AI/TI); metáfase II (MII). CS (controle incubadora com SFB): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; TS (transporte com SFB): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 10% SFB; TB (transporte com BSA): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA. Após transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (duração total da MIV = 24h) em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> em ar, em meio MIV suplementado com 10% SFB; oócitos transportados em meio suplementado com mistura de antioxidantes foram maturados em meio MIV suplementado com a mesma mistura.  
<sup>ab</sup>Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P<0,05$ ).

A suplementação do meio com antioxidantes (Tabela 2) não afetou ( $P>0,05$ ) a progressão da meiose, avaliada ao término do transporte (GV:  $9,6\pm 2,4\%$  a  $20,0\pm 4,5\%$ ; GVBD:  $76,2\pm 2,8\%$  a  $85,7\pm 2,2\%$ ; MI:  $2,8\pm 1,7\%$  a  $5,5\pm 1,9\%$ ; AI/TI: 0%; e MII: 0%) e ao término da MIV (GV: 0%; GVBD:  $6,7\pm 1,6\%$  a  $10,0\pm 1,8\%$ ; MI: 0 a  $2,2\pm 1,0\%$ ; AI/TI: 0 a  $1,41,4\pm\%$ ; e MII:  $87,52,8\pm\%$  a  $91,4\pm 1,0\%$ ).



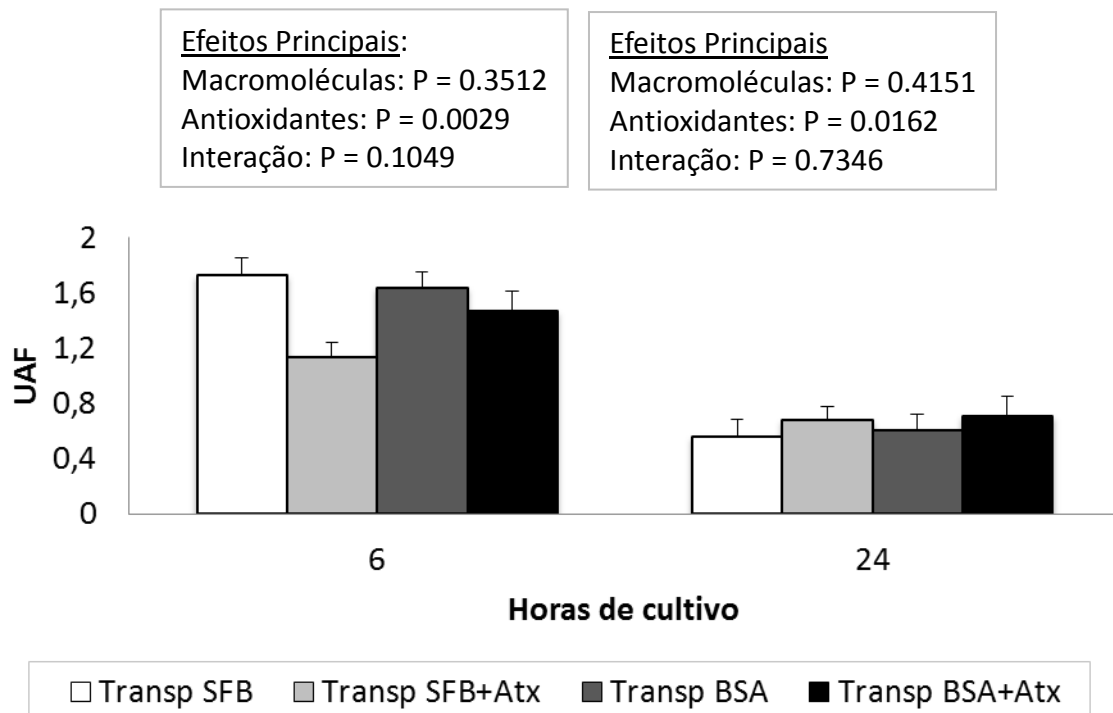
**Tabela 2.** Efeitos da suplementação do meio de transporte com antioxidantes (cisteína + cisteamina + catalase) sobre a maturação nuclear de oócitos bovinos destinados à produção *in vitro* de embriões (médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM)

Grupo	N	Duração da MIV	% GV (LSM $\pm$ EPM)	% GVBD (LSM $\pm$ EPM)	% MI (LSM $\pm$ EPM)	% AI/II (LSM $\pm$ EPM)	% MII (LSM $\pm$ EPM)
C	88	6h	20,0 $\pm$ 4,5	77,0 $\pm$ 3,9	2,8 $\pm$ 1,7	0	0
CA	95		18,3 $\pm$ 2,1	76,2 $\pm$ 2,8	5,4 $\pm$ 1,0	0	0
T	166		9,6 $\pm$ 2,4	85,7 $\pm$ 2,2	4,6 $\pm$ 1,9	0	0
TA	176		10,5 $\pm$ 1,5	83,9 $\pm$ 1,7	5,5 $\pm$ 1,9	0	0
C	67	24h	0	8,5 $\pm$ 1,0	0	0	91,4 $\pm$ 1,0
CA	68		0	8,7 $\pm$ 4,3	0	1,4 $\pm$ 1,4	89,7 $\pm$ 3,7
T	136		0	6,7 $\pm$ 1,6	2,2 $\pm$ 1,0	0,6 $\pm$ 0,6	90,3 $\pm$ 2,2
TA	124		0	10,0 $\pm$ 1,8	2,3 $\pm$ 1,5	0	87,5 $\pm$ 2,8

Vesícula germinativa (VG); quebra da vesícula germinativa (GVBD); metáfase I (MI); anáfase I / telófase I (AI/II); metáfase II (MII). C (controle incubadora): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; CA (controle incubadora com antioxidante): oócitos maturados *in vitro* meio MIV suplementado com 10% SFB e mistura de antioxidantes (100  $\mu$ M de cisteamina, 0,6 mM de cisteína e 100 UI catalase) por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; T (transporte sem antioxidante): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV sem suplementação com a mistura de antioxidantes; TA (transporte com BSA): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com a mistura de antioxidantes. Após transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (duração total da MIV = 24h) em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> em ar, em meio MIV suplementado com 10% SFB; oócitos transportados em meio suplementado com mistura de antioxidantes foram maturados em meio MIV suplementado com a mesma mistura. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos pelo teste de Tukey (P<0,05).

### Concentração intracelular de ROS

As concentrações intracelulares de ROS (expressas em UAF) após 6 horas de transporte simulado e após 24 horas de MIV estão representadas na Figura 3. Como não houve interação entre o efeito da macromolécula e presença de antioxidantes (P>0,05), os dados estão apresentados separadamente, como variáveis independentes (Tabelas 3 e 4).



**Figura 3.** Concentração intracelular de espécies reativas de oxigênio em oócitos submetidos ao transporte simulado com diferentes macromoléculas e na presença ou ausência de antioxidantes. Transp SFB (transporte com SFB): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 10% SFB por 6h; Transp SFB+Atx (transporte com SFB e antioxidante): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 10% SFB e mistura de antioxidantes (100  $\mu$ M de cisteamina, 0,6 mM de cisteína e 100 UI catalase); Transp BSA (transporte com BSA): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA; Transp BSA+Atx (transporte com BSA e antioxidante): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h, em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e mistura de antioxidantes. Após transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (duração total da MIV = 24h) em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> em ar, em meio MIV suplementado com 10% SFB; oócitos transportados em meio suplementado com mistura de antioxidantes foram maturados em meio MIV suplementado com a mesma mistura. Valores expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).

A suplementação do meio com macromoléculas (Tabela 3) não alterou ( $P > 0,05$ ) as concentrações intracelulares de ROS em oócitos submetidos ao transporte simulado por 6 horas (TS:  $1,38 \pm 0,08$ ; TB:  $1,50 \pm 0,08$ ). Porém, oócitos de ambos estes grupos submetidos ao transporte exibiram maiores concentrações ( $P < 0,05$ ) de ROS em comparação com o grupo controle (incubadora de CO<sub>2</sub>:  $1,00 \pm 0,08$ ). Da mesma forma, não foi observada diferença nas concentrações de

ROS intracelulares em oócitos maturados *in vitro* após o transporte simulado (TS:  $0,62 \pm 0,02$ ; e TB:  $0,66 \pm 0,03$ ), porém ambos estes grupos exibiram menores quantidades de ROS ( $P < 0,05$ ) quando comparados ao grupo controle ( $1,00 \pm 0,05$ ).

**Tabela 3.** Efeitos de diferentes macromoléculas (soro fetal bovino ou albumina sérica bovina) utilizadas como suplemento do meio de transporte sobre a concentração intracelular de ROS (expressas em unidades arbitrárias de fluorescência) em oócitos bovinos destinados à produção *in vitro* de embriões (médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM)

Grupo	N	Momento da avaliação	
		Após o transporte (6h)	Após a MIV (24h)
CS	58	$1,00 \pm 0,08^a$	$1,00 \pm 0,05^a$
TS	128	$1,38 \pm 0,08^b$	$0,62 \pm 0,02^b$
TB	126	$1,50 \pm 0,08^b$	$0,66 \pm 0,03^b$

CS (controle incubadora com SFB): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; TS (transporte com SFB): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 10% SFB; TB (transporte com BSA): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA. Após transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (duração total da MIV = 24h) em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> em ar, em meio MIV suplementado com 10% SFB; oócitos transportados em meio suplementado com mistura de antioxidantes foram maturados em meio MIV suplementado com a mesma mistura. <sup>ab</sup>Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

A suplementação com antioxidantes resultou em diferença significativa ( $P > 0,05$ ) nas concentrações intracelulares de ROS encontradas em oócitos ao final do transporte simulado por 6 horas (Tabela 4), sendo que grupo T ( $1,61 \pm 0,08$ ) apresentou maiores ( $P > 0,05$ ) concentrações de ROS quando comparado aos grupos C ( $1,00 \pm 0,08$ ), CA ( $1,14 \pm 0,07$ ) e TA ( $1,22 \pm 0,08$ ). Após 24 horas de MIV, a maior concentração de ROS foi observada no grupo C ( $1,00 \pm 0,05$ ), que diferiu ( $P < 0,05$ ) dos demais grupos. As menores concentrações de ROS foram encontradas no grupo T ( $0,58 \pm 0,02$ ), que diferiu ( $P < 0,05$ ) do grupo CA ( $0,78 \pm 0,05$ ); porém, ambos estes grupos não diferiram ( $P > 0,05$ ) do grupo TA ( $0,70 \pm 0,04$ ).

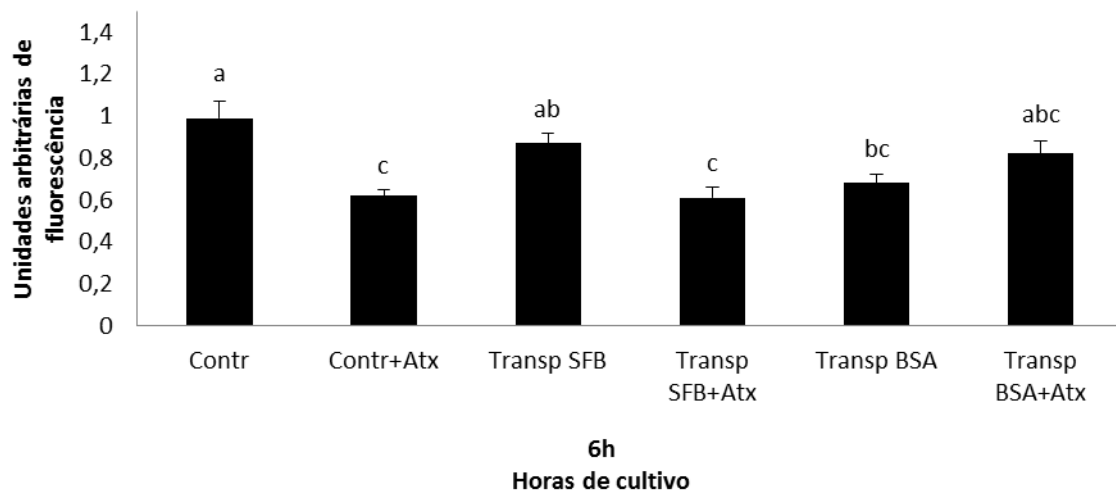
**Tabela 4.** Efeitos da suplementação do meio de transporte com antioxidantes (cisteína + cisteamina + catalase) sobre a concentração intracelular de ROS (expressas em unidades arbitrárias de fluorescência) em oócitos bovinos destinados à produção *in vitro* de embriões (médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM)

Grupo	N	Momento de avaliação	
		Após o transporte (6h)	Após a MIV (24h)
C	58	1,00 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	1,00 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
CA	73	1,14 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	0,78 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>
T	144	1,61 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	0,58 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>
TA	110	1,22 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	0,70 $\pm$ 0,04 <sup>bc</sup>

C (controle incubadora): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; CA (controle incubadora com antioxidante): oócitos maturados *in vitro* meio MIV suplementado com 10% SFB e mistura de antioxidantes (100  $\mu$ M de cisteamina, 0,6 mM de cisteína e 100 UI catalase) por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; T (transporte sem antioxidante): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV sem suplementação com a mistura de antioxidantes; TA (transporte com BSA): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com a mistura de antioxidantes. Após transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (duração total da MIV = 24h) em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> em ar, em meio MIV suplementado com 10% SFB; oócitos transportados em meio suplementado com mistura de antioxidantes foram maturados em meio MIV suplementado com a mesma mistura. <sup>ab</sup>Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

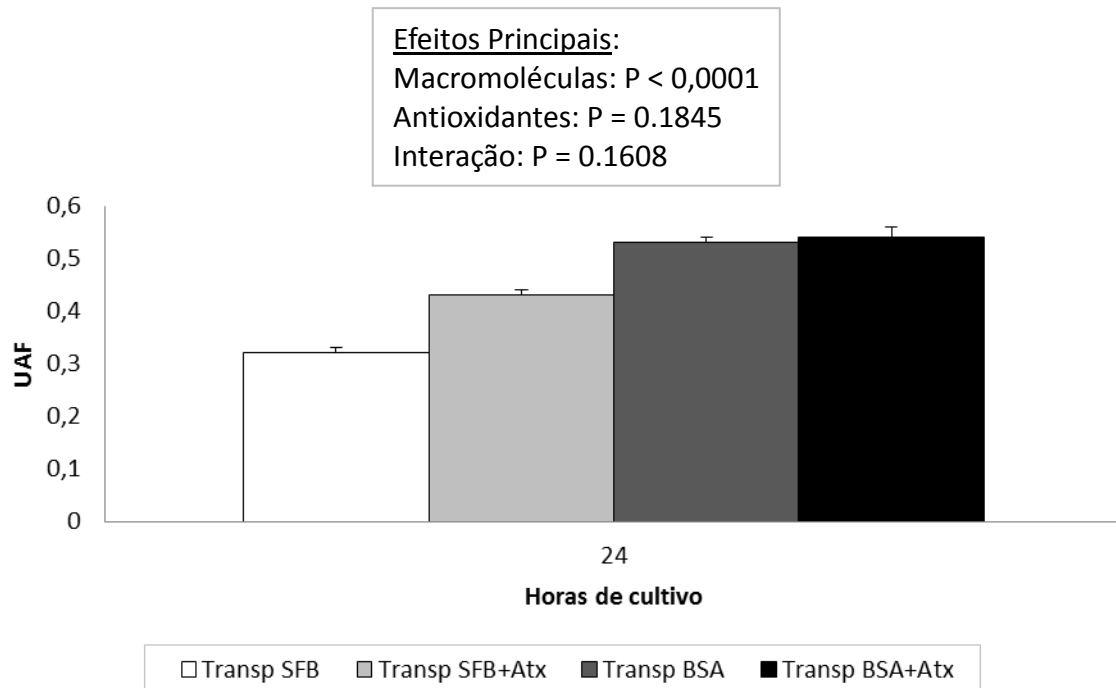
### Potencial de membrana mitocondrial

Foi observada interação (P>0,05) entre o efeito da macromolécula e presença de antioxidantes na análise do PMM em oócitos ao final do transporte simulado, portanto os dados de todos os grupos estão apresentados na Figura 4. O grupo Contr (1,00 $\pm$ 0,05) apresentou o maior PMM, que diferiu (P<0,05) de todos os grupos com exceção de Transp SFB (0,87 $\pm$ 0,05) e Transp BSA+Atx (0,82 $\pm$ 0,06). Os grupos Contr+Atx (0,62 $\pm$ 0,05) e Transp SFB+Atx (0,61 $\pm$ 0,05) exibiram os menores PMMs, diferindo (P<0,05) dos grupos Contr e Transp SFB, porém semelhantes (P>0,05) aos grupos Transp BSA+Atx e Transp BSA (0,68 $\pm$ 0,04).



**Figura 4.** Potencial de membrana mitocondrial em oócitos submetidos ao transporte simulado em meio suplementado com diferentes macromoléculas e na presença ou ausência de antioxidantes. Contr (controle): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB por 6h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; Contr+Atx (controle antioxidante): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB e mistura e antioxidantes (100 µM de cisteamina, 0,6 mM de cisteína e 100 UI catalase) por 6h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; Transp SFB (transporte com SFB): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 10% SFB; Transp SFB+Atx (transporte com SFB e antioxidante): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 10% SFB e mistura e antioxidantes; Transp BSA (transporte com BSA): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6%; Transp BSA+Atx (transporte com BSA e antioxidante): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e mistura e antioxidantes. Valores expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).  
<sup>ab</sup>Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Os resultados da análise do PMM ao final da MIV de oócitos previamente submetidos ao transporte simulado estão apresentados na Figura 5. Como não houve interação entre o efeito da macromolécula e presença de antioxidantes (P>0,05), os dados estão apresentados separadamente, como variáveis independentes (Tabelas 5 e 6).



**Figura 5.** Potencial de membrana mitocondrial ao final do cultivo de maturação de oócitos previamente submetidos ao transporte simulado em meio suplementado com diferentes macromoléculas e na presença ou ausência de antioxidantes. Trnasp SFB (transporte com SFB): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 10% SFB por 6h; Transp SFB+Atx (transporte com SFB e antioxidante): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 10% SFB e mistura de antioxidantes (100  $\mu$ M de cisteamina, 0,6 mM de cisteína e 100 UI catalase); Transp BSA (transporte com BSA): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA; Transp BSA+Atx (transporte com BSA e antioxidante): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h, em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e mistura de antioxidantes. Após transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (duração total da MIV = 24h) em incubadora com 5%  $\text{CO}_2$  em ar, em meio MIV suplementado com 10% SFB; oócitos transportados em meio suplementado com mistura de antioxidantes foram maturados em meio MIV suplementado com a mesma mistura. Valores expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).

A suplementação com diferentes macromoléculas (Tabela 5) resultou em diferença significativa ( $P < 0,05$ ) no PMM de oócitos ao final da MIV, sendo que o maior valor foi observado no grupo C ( $1,00 \pm 0,05$ ) e o menor valor no grupo TS ( $0,41 \pm 0,01$ ); ambos estes grupos diferiram ( $P < 0,05$ ) do grupo TB ( $0,57 \pm 0,02$ ).

**Tabela 5.** Efeitos de diferentes macromoléculas (soro fetal bovino ou albumina sérica bovina) utilizadas como suplemento do meio de transporte sobre o potencial de membrana mitocondrial (expresso em unidades arbitrárias de fluorescência) em oócitos bovinos destinados à produção *in vitro* de embriões (médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM)

Grupo	N	Unidades arbitrárias de fluorescência (LSM $\pm$ SEM)
CS	62	1,0 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
TS	116	0,4 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>
TB	121	0,5 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>

CS (controle incubadora com SFB): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; TS (transporte com SFB): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 10% SFB; TB (transporte com BSA): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA. Após transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (duração total da MIV = 24h) em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> em ar, em meio MIV suplementado com 10% SFB; oócitos transportados em meio suplementado com mistura de antioxidantes foram maturados em meio MIV suplementado com a mesma mistura. <sup>ab</sup>Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

A suplementação com antioxidantes (Tabela 6) não alterou (P>0,05) o PMM de oócitos maduros que foram previamente submetidos ao transporte simulado (T: 0,48 $\pm$ 0,01 vs. TA: 0,51 $\pm$ 0,02). Porém, ambos estes grupos diferiram (P<0,05) de C (1,00 $\pm$ 0,05) e de CA (0,84 $\pm$ 0,04), os quais também diferiram entre si (P<0,05).

**Tabela 6.** Efeitos da suplementação do meio de transporte com antioxidantes (cisteína + cisteamina + catalase) sobre o potencial de membrana mitocondrial (expresso em unidades arbitrárias de fluorescência) em oócitos bovinos destinados à produção *in vitro* de embriões (médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM)

Grupo	N	Unidades arbitrárias de fluorescência (LSM $\pm$ SEM)
C	62	1,0 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
CA	62	0,8 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>
T	120	0,4 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>
TA	117	0,5 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>

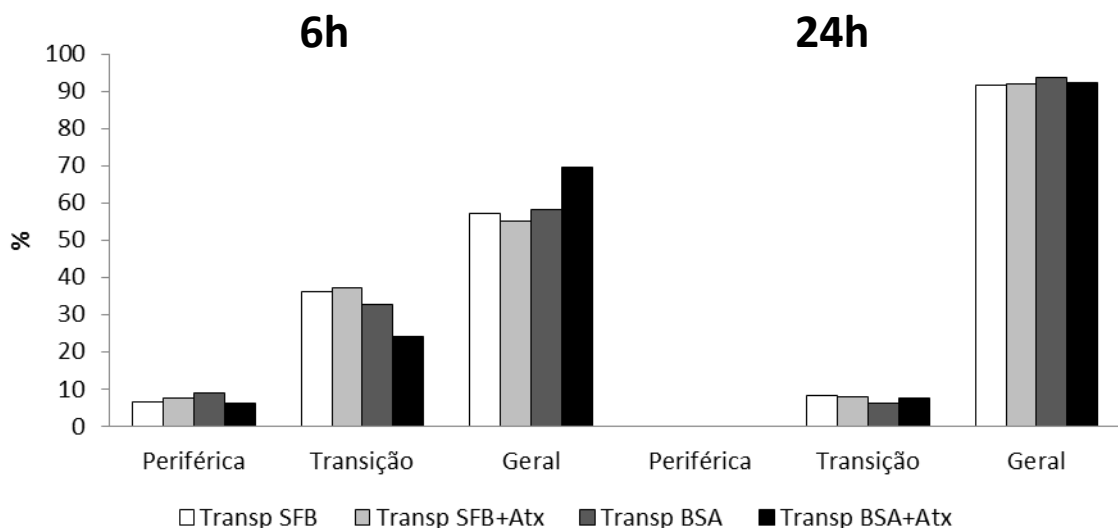
C (controle incubadora): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; CA (controle incubadora com antioxidante): oócitos maturados *in vitro* meio MIV suplementado com 10% SFB e mistura de antioxidantes (100  $\mu$ M de cisteamina, 0,6 mM de cisteína e 100 UI catalase) por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; T (transporte sem antioxidante): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV sem suplementação com a mistura de antioxidantes; TA (transporte com BSA): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com a mistura de antioxidantes. Após transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (duração total da MIV = 24h) em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> em ar, em meio MIV suplementado com 10% SFB; oócitos transportados em meio suplementado com mistura de antioxidantes foram maturados em

meio MIV suplementado com a mesma mistura. <sup>ab</sup>Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

### Distribuição citoplasmática das mitocôndrias

A distribuição citoplasmática das mitocôndrias após 6 horas de transporte simulado e após 24 horas de MIV está representada na Figura 6. Como não houve interação entre o efeito da macromolécula e presença de antioxidantes ( $P > 0,05$ ), os dados estão apresentados separadamente, como variáveis independentes (Tabelas 7 e 8).

A suplementação do meio com diferentes macromoléculas (Tabela 7) não afetou ( $P > 0,05$ ) o reposicionamento citoplasmático das mitocôndrias em oócitos avaliados ao término do transporte, sendo a maior parte das mitocôndrias encontrava-se em fase de transição (29,3% a 48,8%) ou dispersas no citoplasma (39,8% a 62,7%), e em menor parte na periferia dos oócitos (7,1% a 11,3%). Após 24 horas de MIV, as mitocôndrias ocupavam a posição predominantemente dispersa no citoplasma do oócito (90,0% a 92,9%). Não foram encontradas mitocôndrias na periferia do oócito e poucas se encontravam em transição (7,0% a 9,9%), sendo que os grupos não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre si.



**Figura 6.** Distribuição citoplasmática das mitocôndrias em oócitos submetidos ao transporte simulado em meio suplementado com diferentes macromoléculas e na presença ou ausência de antioxidantes. Transp SFB (transporte com SFB): oócitos



submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 10% SFB por 6h; Transp SFB+Atx (transporte com SFB e antioxidante): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 10% SFB e mistura de antioxidantes (100  $\mu$ M de cisteamina, 0,6 mM de cisteína e 100 UI catalase); Transp BSA (transporte com BSA): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA; Transp BSA+Atx (transporte com BSA e antioxidante): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h, em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e mistura de antioxidantes. Após transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (duração total da MIV = 24h) em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> em ar, em meio MIV suplementado com 10% SFB; oócitos transportados em meio suplementado com mistura de antioxidantes foram maturados em meio MIV suplementado com a mesma mistura.

Da mesma forma, a suplementação do meio com antioxidantes (Tabela 8) não afetou ( $P>0,05$ ) o reposicionamento citoplasmático das mitocôndrias em oócitos avaliados ao término do transporte, sendo que neste momento a maior parte das mitocôndrias encontrava-se em transição (31,2% a 48,8%) ou estavam dispersas no citoplasma (39,8% a 68,7%), havendo poucas mitocôndrias na periferia do oócito (0 a 11,3%). Ao término da MIV, a maior parte das mitocôndrias estava distribuída de forma dispersa (90,0% a 94,0%), havendo poucas em transição (5,9% a 9,9%) e nenhuma se localizava na periferia do oócito, sendo que os grupos não diferiram ( $P>0,05$ ) entre si.

**Tabela 7.** Efeitos da suplementação do meio de transporte com diferentes fontes de macromoléculas sobre a distribuição citoplasmática das mitocôndrias de oócitos bovinos destinados à produção *in vitro* de embriões (médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM)

Grupo	N	Duração da MIV	% Periférica (LSM $\pm$ SEM)	% Transição (LSM $\pm$ SEM)	% Geral (LSM $\pm$ SEM)
CS	89	6h	11,3 $\pm$ 6,8	48,8 $\pm$ 1,9	39,8 $\pm$ 5,5
TS	176		7,1 $\pm$ 1,3	36,6 $\pm$ 7,4	56,1 $\pm$ 8,2
TB	156		7,8 $\pm$ 2,2	29,3 $\pm$ 5,1	92,7 $\pm$ 7,1
CS	81	24h	0	9,9 $\pm$ 1,3	90,0 $\pm$ 1,3
TS	166		0	8,1 $\pm$ 2,3	91,8 $\pm$ 2,3
TB	153		0	7,0 $\pm$ 1,3	92,9 $\pm$ 1,3

CS (controle incubadora com SFB): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; TS (transporte com SFB): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 10% SFB; TB (transporte com BSA): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA. Após transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (duração total da MIV = 24h) em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> em ar, em meio MIV suplementado com 10% SFB; oócitos transportados em meio suplementado com mistura de antioxidantes foram maturados em meio MIV suplementado com a mesma mistura. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $P<0,05$ ).

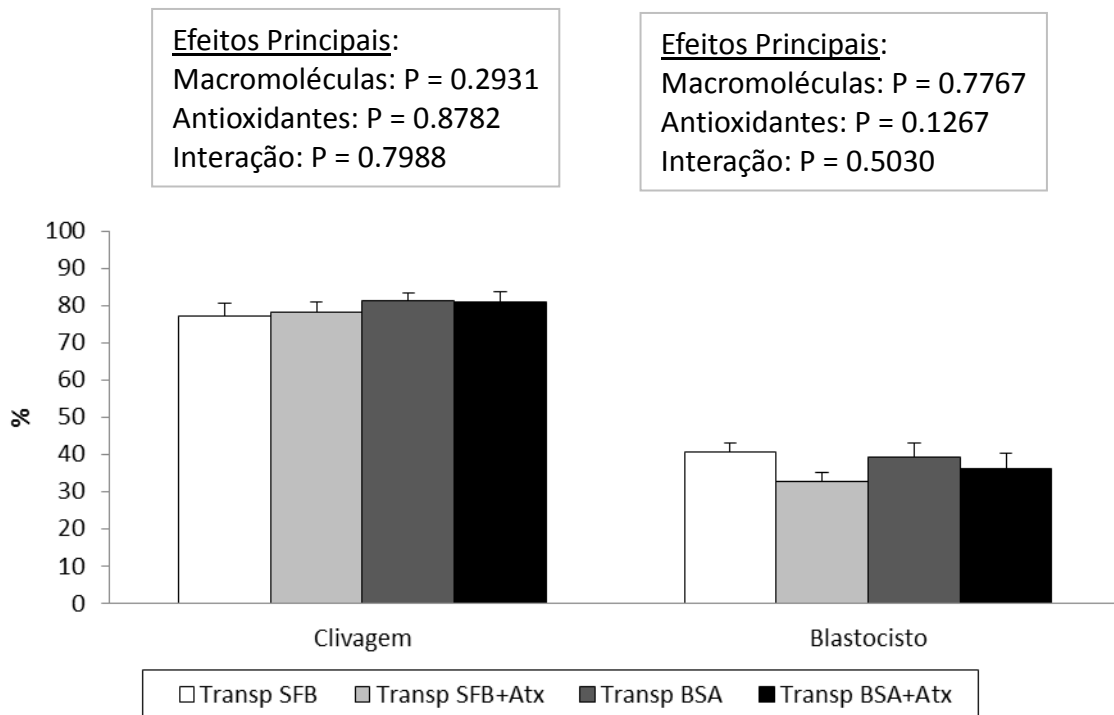
**Tabela 8.** Efeitos da suplementação do meio de transporte com antioxidantes (cisteína + cisteamina + catalase) sobre a distribuição citoplasmática das mitocôndrias de oócitos bovinos destinados à produção *in vitro* de embriões (médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM)

Grupo	N	Duração da MIV	% Periférica (LSM $\pm$ SEM)	% Transição (LSM $\pm$ SEM)	% Geral (LSM $\pm$ SEM)
C	89	6h	11,3 $\pm$ 6,8	48,8 $\pm$ 8,1	39,8 $\pm$ 5,5
CA	73		0	31,2 $\pm$ 9,9	68,7 $\pm$ 4,0
T	192		7,7 $\pm$ 1,6	34,4 $\pm$ 5,7	57,7 $\pm$ 6,6
TA	140		7,0 $\pm$ 1,9	32,03 $\pm$ 6,2	60,9 $\pm$ 9,5
C	81	24h	0	9,9 $\pm$ 1,3	90,0 $\pm$ 1,3
CA	78		0	5,9 $\pm$ 4,2	94,0 $\pm$ 4,2
T	158		0	7,2 $\pm$ 2,0	92,7 $\pm$ 2,0
TA	161		0	7,8 $\pm$ 1,8	92,1 $\pm$ 1,8

C (controle incubadora): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; CA (controle incubadora com antioxidante): oócitos maturados *in vitro* meio MIV suplementado com 10% SFB e mistura de antioxidantes (100  $\mu$ M de cisteamina, 0,6 mM de cisteína e 100 UI catalase) por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; T (transporte sem antioxidante): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV sem suplementação com a mistura de antioxidantes; TA (transporte com BSA): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com a mistura de antioxidantes. Após transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (duração total da MIV = 24h) em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> em ar, em meio MIV suplementado com 10% SFB; oócitos transportados em meio suplementado com mistura de antioxidantes foram maturados em meio MIV suplementado com a mesma mistura. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos pelo teste de Tukey (P<0,05).

### Desenvolvimento embrionário

As taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos para os diferentes tratamentos estão representadas na Figura 7. Como não houve interação entre o efeito da macromolécula e presença de antioxidantes (P>0,05), os dados estão apresentados separadamente, como variáveis independentes (Tabelas 9 e 10).



**Figura 7.** Clivagem e desenvolvimento de embriões produzidos a partir de oócitos bovinos submetidos ao transporte simulado em meio suplementado com diferentes macromoléculas e na presença ou ausência de antioxidantes. Transp SFB (transporte com SFB): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 10% SFB por 6h; Transp SFB+Atx (transporte com SFB e antioxidante): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 10% SFB e mistura de antioxidantes (100  $\mu$ M de cisteamina, 0,6 mM de cisteína e 100 UI catalase); Transp BSA (transporte com BSA): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA; Transp BSA+Atx (transporte com BSA e antioxidante): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h, em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e mistura de antioxidantes. Após transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (duração total da MIV = 24h) em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> em ar, em meio MIV suplementado com 10% SFB; oócitos transportados em meio suplementado com mistura de antioxidantes foram maturados em meio MIV suplementado com a mesma mistura.

A suplementação do meio de transporte com diferentes macromoléculas (Tabela 9) não afetou ( $P > 0,05$ ) as taxas de clivagem ( $77,7 \pm 2,1\%$  a  $83,4 \pm 2,7\%$ ) e de desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto ( $36,6 \pm 1,9\%$  a  $39,8 \pm 4,5\%$ ).

Da mesma forma, a suplementação do meio de transporte com antioxidantes (Tabela 10) não afetou ( $P > 0,05$ ) as taxas de clivagem ( $77,6 \pm 3,7\%$  a  $83,4 \pm 2,7\%$ ) e de desenvolvimento embrionário ( $33,2 \pm 3,4\%$  a  $39,8 \pm 4,5\%$ ).

**Tabela 9.** Clivagem e desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* a partir de oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6 horas em meio suplementado com diferentes macromoléculas (médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM)

Grupo	N oócitos	% Clivagem (LSM $\pm$ SEM)	% Blastocisto (LSM $\pm$ SEM)
CS	223	83,4 $\pm$ 2,7	39,8 $\pm$ 4,5
TS	398	77,7 $\pm$ 2,1	36,6 $\pm$ 1,9
TB	447	81,0 $\pm$ 2,1	37,6 $\pm$ 2,8

CS (controle incubadora com SFB): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; TS (transporte com SFB): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 10% SFB; TB (transporte com BSA): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA. ). Após transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (duração total da MIV = 24h) em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> em ar, em meio MIV suplementado com 10% SFB; oócitos transportados em meio suplementado com mistura de antioxidantes foram maturados em meio MIV suplementado com a mesma mistura. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos pelo teste de Tukey (P<0,05).

**Tabela 10.** Clivagem e desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* a partir de oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6 horas em meio suplementado com antioxidantes (cisteína + cisteamina + catalase) (médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM)

Grupo	N oócitos	% Clivagem (LSM $\pm$ SEM)	% Blastocisto (LSM $\pm$ SEM)
C	223	83,4 $\pm$ 2,7	39,8 $\pm$ 4,5
CA	208	76,6 $\pm$ 3,7	33,2 $\pm$ 3,4
T	408	79,2 $\pm$ 2,3	39,8 $\pm$ 2,2
TA	437	79,6 $\pm$ 1,9	34,5 $\pm$ 2,5

C (controle incubadora): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; CA (controle incubadora com antioxidante): oócitos maturados *in vitro* meio MIV suplementado com 10% SFB e mistura de antioxidantes (100  $\mu$ M de cisteamina, 0,6 mM de cisteína e 100 UI catalase) por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; T (transporte sem antioxidante): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV sem suplementação com a mistura de antioxidantes; TA (transporte com BSA): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com a mistura de antioxidantes. ). Após transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (duração total da MIV = 24h) em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> em ar, em meio MIV suplementado com 10% SFB; oócitos transportados em meio suplementado com mistura de antioxidantes foram maturados em meio MIV suplementado com a mesma mistura. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos pelo teste de Tukey (P<0,05).

## Vitrificação

Foi realizado o estudo comparativo da sobrevivência pós-aquecimento, as taxas de re-expansão embrionária após aquecimento e cultivo *in vitro* por 24 horas podem ser visualizadas na Tabela 11. A suplementação do meio de transporte com macromoléculas (SFB ou BSA) e/ou antioxidantes não afetou ( $P>0,05$ ) a taxa re-expansão embrionária (40,9% a 69,5%).

**Tabela 11.** Taxas de re-expansão após aquecimento e cultivo *in vitro* por 24 horas de embriões bovinos produzidos *in vitro* a partir de oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6 horas em meio suplementado com diferentes macromoléculas (SFB ou BSA) e/ou antioxidantes (cisteína + cisteamina + catalase)

Grupos	Embriões Desvitrificados (n)	Re-expansão 24 h n (%)
Contr	23	16 (69,5%)
Contr+Atx	23	13 (56,5%)
Transp SFB	22	9 (40,9%)
Transp SFB+A	29	13 (44,8%)
Transp BSA	14	7 (50,0%)
Transp BSA+Atx	16	9 (56,2%)

Ccontr (controle): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB por 6h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; Contr+Atx (controle antioxidante): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB e mistura e antioxidantes (100 µM de cisteamina, 0,6 mM de cisteína e 100 UI catalase) por 6h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; Transp SFB (transporte com SFB): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 10% SFB; Transp SFB+Atx (transporte com SFB e antioxidante): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 10% SFB e mistura e antioxidantes; Transp BSA (transporte com BSA): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6%; Transp BSA+Atx (transporte com BSA e antioxidante): oócitos submetidos ao transporte simulado durante 6h em incubadora Minitub, em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e mistura e antioxidantes. ). Após transporte, os oócitos foram maturados por 18 horas (duração total da MIV = 24h) em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> em ar, em meio MIV suplementado com 10% SFB; oócitos transportados em meio suplementado com mistura de antioxidantes foram maturados em meio MIV suplementado com a mesma mistura. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $P<0,05$ ).

## DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da suplementação do meio de transporte de oócitos bovinos com diferentes fontes de macromoléculas (SFB ou BSA) e com a adição de antioxidantes (cisteína + cisteamina + catalase) no transporte e na MIV, sobre a qualidade oocitária e sobre o subsequente desenvolvimento e criotolerância dos embriões. Para tanto, foi necessário avaliar a

qualidade oocitária através da maturação nuclear, produção de ROS, potencial de membrana mitocondrial e distribuição das mitocôndrias. O desenvolvimento embrionário foi avaliado pela clivagem e produção de blastocistos, e a criotolerância pela re-expansão dos embriões após desvitrificação. A macromolécula e/ou os antioxidantes utilizados não influenciaram o desenvolvimento embrionário. No entanto, o transporte teve efeitos sobre o oócito, pois acelerou a meiose, gerou maior produção intracelular de espécies reativas de oxigênio e menor potencial de membrana mitocondrial.

As condições de transporte dos oócitos são consideradas um fator limitante para a difusão PIV, pois a temperatura, o pH do meio e a duração do transporte podem influenciar na competência do oócito e, assim, diminuir sua viabilidade (MIRANDA et al., 2007; SILVA et al., 2011). Os oócitos que foram submetidos ao transporte, independentemente da macromolécula utilizada, apresentaram maior concentração intracelular de ROS quando comparado aos grupos que permaneceram por todo período em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub>. Durante o transporte não há o controle da atmosfera gasosa, este fator pode ter levado à alteração do pH do meio, além da possível hiperoxia devido a elevada tensão de O<sub>2</sub> e aumento da atividade enzimática das oxidases, culminando assim na elevação da produção de ROS (GUÉRIN et al., 2001; GUEMRA et al., 2014).

Nos oócitos submetidos ao transporte em meio suplementado com antioxidantes (TA), a concentração intracelular de ROS se equiparou à do grupo mantido por todo período em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> em ar. Por outro lado, nos oócitos transportados sem a suplementação de antioxidantes houve maior produção de ROS. Estes achados corroboram com dados de Harvey et al. (2007), que relataram que os antioxidantes foram eficientes apenas quando as condições de cultivo por si só se mostram inadequadas. O mesmo ocorreu no presente estudo, pois os antioxidantes foram eficientes apenas quando as condições de cultivo se mostraram mais adversas (durante o transporte), não sendo evidenciada sua ação quando os oócitos foram cultivados em condições mais controladas, dentro da incubadora.

Com relação à maturação nuclear, após 6 horas foi encontrada maior taxa de GVBD nos oócitos submetidos ao transporte em comparação com aqueles cultivados em incubadora. Esta aceleração da meiose pode ser supostamente atribuída à elevação das ROS, já que o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) atua como molécula sinalizadora e modula vários aspectos da fisiologia do oócito, incluindo o bloqueio e retomada do ciclo meiótico (COMBELLES et al., 2009; LOPES et al., 2010; PANDEY et al., 2010). Quando a concentração intracelular de  $H_2O_2$  encontra-se elevada e o óxido nítrico (NO) diminuído, vai ocorrer uma sinalização para induzir a retomada da meiose, o que possivelmente pode ter ocorrido neste trabalho.

Durante a MIV, há o reposicionamento das mitocôndrias em direção às áreas que requerem mais energia, sendo observada a movimentação a partir da região mais periférica, no oócito imaturo (VG), em direção à posição mais dispersa no citoplasma após 12 a 18 horas de cultura, de GVBD até MII (HYTTEL et al., 1986; NISHI et al., 2003; FERREIRA et al., 2009). Após 6 horas de transporte as mitocôndrias se encontravam entre transição e dispersas, e após 24 horas de MIV quando os oócitos se encontravam em MII as mitocôndrias estavam distribuídas de forma heterogênea, dispersas no citoplasma, como sugerido por Ferreira et al. (2009). Isto ocorre porque conforme há progressão da maturação nuclear, ocorre a migração das mitocôndrias para os locais que requerem mais energia na célula.

A mitocôndria sintetiza, através da  $\beta$ -oxidação, o trifosfato de adenosina (ATP) necessário para suportar os processos de maturação oocitária, fertilização e desenvolvimento embrionário (VAN BLERKOM, 2011; DADARWAL et al., 2015). A  $\beta$ -oxidação implica em cinco complexos enzimáticos chamados de cadeia respiratória (ou cadeia transportadora de elétrons) para a produção de ATP. Entretanto, durante esse processo pode haver perda de elétrons entre os complexos e estes elétrons podem se ligar ao oxigênio produzindo, então, as ROS (BARJA, 2007; ANDRADE et al., 2010). Neste experimento foi verificado que, após o término da MIV, o grupo controle que não foi suplementado com antioxidantes apresentou maior PMM e maior concentração intracelular de ROS, sugerindo que a maior atividade mitocondrial pode ter elevado a produção de ROS. Ao contrário, os oócitos do grupo transporte sem antioxidantes apresentaram menor PMM com consequente

menor produção de ROS quando comparado aos demais grupos, sugerindo que a menor atividade das mitocôndrias ocasionou a menor produção de ROS.

A macromolécula utilizada também pode ter influência sobre o PMM, pois o SFB, comumente utilizado nos meios de MIV, contém alta concentração lipídica, e o acúmulo lipídico pode causar efeitos prejudiciais na membrana da mitocôndria devido à formação de amônia como substrato (RUSSEL et al., 2006). O resultado encontrado neste experimento corrobora com os achados de Russel et al. (2006), já que ao fim da MIV o grupo suplementado por todo período com SFB mostrou menor PMM quando comparado ao grupo suplementado com BSA durante o transporte. O BSA é uma fonte proteica que comumente é utilizada em substituição ao soro nos meios de MIV (DEL COLLADO et al., 2015).

De acordo com Pribenszky et al. (2012) e Thorpe et al. (2013), o estresse controlado por peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pode conferir resistência à célula ao estresse oxidativo. Uma vez que elevadas concentrações intracelulares de  $H_2O_2$  podem estimular a produção do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) pela mitocôndria (citocromo b no complexo III da cadeia respiratória). O  $O_2^-$ , em baixas concentrações, pode possuir efeito benéfico de proteção à célula, pois vai estimular a síntese e a elevação dos antioxidantes MnSOD, GSH, GPRx e catalase, que atuam na neutralização das ROS (THORPE et al., 2013). O mecanismo de defesa das células descrito anteriormente pode explicar as menores produções de ROS encontradas às 24 horas de MIV neste estudo. Os oócitos mostraram-se tolerantes às ROS, possivelmente porque o transporte proporcionou o estresse necessário para que os oócitos conseguissem aumentar suas reservas antioxidantes e neutralizar às ROS. Por isso, ao fim da MIV foram observadas produções menores de ROS do que às observadas após 6 horas de transporte.

A suplementação do meio com a mistura dos antioxidantes cisteína, cisteamina e catalase, durante o transporte simulado e na MIV, não demonstrou efeito positivo nos oócitos, nem sobre a produção de embriões. O resultado encontrado pode significar que neste sistema a dose e a mistura dos antioxidantes intra e extra-celulares utilizados durante o transporte e na MIV não foi eficaz, pois diversos trabalhos relataram o aumento na produção de embriões decorrentes da



suplementação da MIV com antioxidantes (NABENISHI et al., 2011; MERTON et al., 2013).

Quando comparados os grupos cultivados por todo o período em incubadora à 5% de CO<sub>2</sub> e os grupos transportados, observamos que o transporte simulado de oócitos bovinos por 6 horas ocasionou elevação das espécies reativas de oxigênio, acelerou a maturação nuclear e diminuiu o potencial da membrana mitocondrial de oócitos maduros. Possivelmente isto se deva às condições como pH do meio, atmosfera gasosa e a duração do transporte, ou seja, condições sub-ótimas de cultivo que possam ter afetado o metabolismo da célula, gerando a elevação das ROS que acarretou na diminuição do PMM e aceleração da meiose, como já descrito anteriormente. No entanto, apesar das diferenças encontradas nos oócitos dos grupos transportados e controle, não houve diferença com relação às taxas de clivagem, blastocisto e re-expansão embrionária. Possivelmente porque o oócito conseguiu ativar mecanismos de defesa e neutralizar as ROS, como sugerido por Thorpe et al. (2013), pois a possível elevação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ocasionar a produção de do ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) pela mitocôndria. Desta forma, pode-se hipotetizar que os pequenos aumentos dos níveis do O<sub>2</sub><sup>-</sup> pela mitocôndria tenham ativado as defesas antioxidantes, o que proporcionou proteção à célula. Todavia, não foram avaliadas as concentrações de O<sub>2</sub><sup>-</sup> neste estudo, então esta hipótese necessita ser comprovada. Mas se esta suposição for verdadeira, possivelmente o aumento na contração de ROS durante o transporte tenha desencadeado ativação deste mecanismo de defesa, sendo possível evidenciar a diminuição das ROS ao fim da maturação. Assim sendo, após o término da MIV, os oócitos conseguiram neutralizar as ROS, diminuindo sua concentração intracelular, o que possivelmente permitiu uma produção embrionária semelhante à obtida *in vitro* a partir de oócitos que não foram submetidos ao transporte.

O meio de MIV pode ter influência sobre a qualidade dos embriões produzidos *in vitro*, a suplementação do meio com antioxidantes (cisteína e cisteamina) pode elevar a concentração intracelular de GSH. Esta elevação de GSH durante a maturação está relacionada com a competência oocitária para o subsequente desenvolvimento embrionário e com a viabilidade após a criopreservação (FURNUS et al. 2008). Porém neste estudo não foi evidenciado o aumento da criotolerância

dos embriões obtidos à partir de oócitos tratados com antioxidantes, possivelmente porque este tratamento foi eficaz apenas durante o período de transporte.

A macromolécula utilizada (SFB ou BSA) também pode influenciar a qualidade oocitária e o futuro desenvolvimento embrionário. De acordo com Shirazi et al. (2012), os embriões obtidos à partir de oócitos MIV em meio suplementado com SFB apresentaram maior tamanho e maior acúmulo lipídico com conseqüente menor criotolerância quando comparado a BSA. Todavia no presente estudo não foram encontradas diferenças entre as taxas de re-expansão quando avaliada a suplementação com SFB ou BSA e/ou antioxidantes. Possivelmente porque a fonte proteica BSA foi utilizada apenas durante o transporte, e após este período os oócitos foram submetidos a MIV em meio com SFB.

## **CONCLUSÃO**

Concluiu-se que a suplementação com SFB ou BSA durante o transporte, e com antioxidantes durante o transporte e a maturação *in vitro* não influenciaram no desenvolvimento embrionário. A mistura dos antioxidantes cisteína, cisteamina e catalase foi eficiente apenas sob as condições de transporte em incubadora portátil, não sendo evidenciada sua ação nas condições de MIV em incubadora à 5% de CO<sub>2</sub>. Apesar das condições de transporte possivelmente terem elevado a concentração intracelular de ROS e acelerado a meiose, os oócitos conseguiram reverter estes resultados após a MIV. Desta forma não foi evidenciada diferenças na produção *in vitro* de embriões entre os grupos experimentais.

## REFERÊNCIAS

- ABE H.; YAMASHITA S.; ITOH T.; SATOH T.; HOSHI H. Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro-matured and -fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. **Mol Reprod Dev.**, v. 53, p.325-335, 1999.
- ABE H., HOSHI, H., Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. **Journal of Reproduction and Development**, v.49, p.193–202, 2003.
- AL DARWICH A.; PERREAU C.; PETIT M. H.; PAPILLIER P.; DUPONT J.; GUILLAUME D.; MERMILLOD P.; GUIGNOT. Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPK $\alpha$  phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. **Prostaglandins and other lipid mediators**, v.93, p.30-36, 2011.
- 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.
- ANDRADE E. R.; MELO-STERZA F. A.; SENEDA M. M.; ALFIERI A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, p.79-85, 2010.
- BALASUBRAMANIAN S.; SON W. J.; KUMAR B. M.; OCK S. A.; YOO J. G.; IM G. S.; et al. Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of in vitro and in vivo preimplantation bovine embryos. **Theriogenology**, v.68, p.265–75, 2007.
- BARJA G. Mitochondrial Oxygen Consumption and Reactive Oxygen Species Production are Independently Modulated: Implications for Aging Studies. **Rejuvenation Res**, v.10, P.215-224, 2007.
- BERHMAN, H.R.; KODAMAN, P.H.; PRESTON, S.L.; GAO, S. Oxidative stress on the ovary. **J. Soc. Gynecol. Investig.**, v.8, p.40-42, 2001.
- BILODEAU J. F. AND HUBEL C. A. Current Concepts in the Use of Antioxidants for the Treatment of Preeclampsia. **J Obstet Gynaecol Can.**, v. 25, p.742-750, 2003.
- BONI, R. Ovum pick-up em bovinos: uma análise retrospectiva de 25 anos **Anim Reprod**, v.9, p. 362-369, 2012.
- COMBELLES M.H.C.; GUPTA S.; AGARWAL A. Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? **Reproductive BioMedicine Online**, v.18, p.864-880, 2009.
- DADARWAL D.; ADAMS G. P.; HYTTEL P.; BROGLIATTI G. M.; CALDWELL S.; SINGH J. Organelle reorganization in bovine oocytes during dominant follicle growth and regression. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.13, p.124, 2015.

DEL COLLADO M.; SARAIVA N. Z.; LOPES F. L.; GASPAR R. C.; PADILHA L. C.; COSTA R. R.; ROSSI G. F.; VANTINI R.; GARCIA J. M. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during *in vitro* maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v., p., 2015.

DELEUZE, S.; GOUDET, G. Cysteamine supplementation of of *in vitro* maturation media: a review. **Reprod. Dom. Anim.**, v.45, p.476-482, 2010.

DEMYDA-PEYRA S.; DORADO J.; HIDALGO M.; ANTER J.; DE LUCA L.; GENERO E.; MORENO-MILLAN M. Effects of oocyte quality, incubation time and maturation environment on the number of chromosomal abnormalities in IVF-derived early bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, p. 1077-1084, 2013.

FERREIRA E. M.; VIREQUE A. A.; ADONA P. M.; MEIRELLES F. V.; FERRIANI R. A.; NAVARRO P. A. A. Maturação citoplasmática de oócitos bovinos: aquisição de competência para o desenvolvimento. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 32, p.172-181, 2009.

FURNUS, C. C.; DE MATOS, D. G.; PICCO, S., GARCÍA, P. P.; INDA, A. M., MATTIOLO, G.; ERRECALDE, A. L. Metabolic requirements associated with GSH synthesis during *in vitro* maturation of cattle oocytes. **Anim. Reprod. Sci.** v.109,p. 88–99, 2008.

GARCIA, J.M. Produção *in vitro* de embriões bovinos: diferentes procedimentos. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.26, p.280-282, 1998.

GOTO, Y.; NODA, Y.; MORI, T.; NAKANO, M. Increased generation of reactive oxygen species in embryo cultured *in vitro*. **Free Rad.Biol.Med.**, v.15, p.69-75, 1993.

GUEMRA S.; SANTO E. S.; ZANIN R.;MONZANI P. S.;SOVERNIGO T. C.;OHASHI O. M.; LEAL C. L. V.; ADONA P. R. Effect of temporary meiosis block during prematuration of bovine cumulus–oocyte complexes on pregnancy rates in a commercial setting for *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v.81, p.982-987, 2014.

GUÉRIN, P.; MOUATASSIM, S.EL.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v.7, p.175-189, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C.; CROSS, C.E. Review article: free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? **J. Lab.Clin. Med.**,v.119, p.598-620, 1992.

HARVEY, A.J. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. **Anim. Reprod. Scien.**, v.98, p.113-128, 2007.

HYTTEL P.; XU K. P.; SMITH S.; GREVE T. Ultrastructure of *in-vitro* oocyte maturation in cattle. **J. Reprod. Fertil.**, v. 78, p. 615–625, 1986.

ISHIKAWA, W. Oxygen radicals-superoxide dismutase system and reproduction medicine. **Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi**, v.45, p.842-848, 1993.

JOHNSON, M.H.; NARS-ESFAHANI, M.H. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*? **Bioessays**, v.16, p.31-39, 1994.

KIM, J.Y., KINOSHITA, M., OHNISHI, M., FUKUI, Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and *in vitro* matures bovine oocytes. **Reproduction**, v.122, p.131-138, 2001.

KITAGAWA, Y.; SUZUKIB, K.; YONEDAA, A.; WATANABEA, T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation on porcine embryos. **Theriogenology**, v.62, p.1186-1283, 2004.

Li J, Foote RH, Simkin M. (1993). Development of rabbit zygotes cultured in protein free medium with catalase, taurine, and superoxide dismutase. *Biol. Reprod.*, 99, 33–37.

LONERGAN P. State-of-the-art embryo technologies in cattle. **Society of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 64, p.315–325, 2007.

LOPES A.S., LANE M. AND THOMPSON J.G.. Oxygen consumption and ROS production are increased at the time of fertilization and cell cleavage in bovine zygotes. **Human Reproduction**, v.25,n.11, p. 2762–2773, 2010.

MERTON J. S.; KNIJN H. M.; FLAPPER H.; DOTINGA F.; ROELEN B. A. J.; VOS P. L. A. M.; MULLAART E. Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation of slaughterhouse- and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf characteristics. **Theriogenology**, v.80, p.365-371, 2013.

MIRANDA, M.S.; CARVALHO, C.M.F; CORDEIRO, M.S.; SANTOS, S.S.D.; OHASHI, O.M. Sistemas alternativos de incubação e meios de cultivo para produção *in vitro* de embrião bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.218-223, 2007.

MOROTTI, F., SANCHES, BV, PONTES, JH, BASSO, AC, SIQUEIRA, ER, LISBOA, LA et al, Taxa de gravidez e taxa de nascimento de bezerros de um programa de fertilização *in vitro* em larga escala utilizando sêmen reverso-ordenadas em *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, e bovinos *Bos taurus*. **Theriogenology**, v.81, p. 696-701, 2014.

NABENISHI H, OHTA H, NISHIMOTO T, MORITA T, ASHIZAWA K, TSUZUKI Y. The effects of cysteine addition during *in vitro* maturation on the developmental competence, ROS, GSH and apoptosis level of bovine oocytes exposed to heat stress. **Zygote**, v.20, p.249-259, 2011.

NARS-ESFAHANI, M.H.; AITKEN, J.R.; JOHNSON, M.H. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stages embryos developed *in vitro* or *in vivo*. **Development.**, v.109, p.501-508, 1990.

NARS-ESFAHANI, M.H.; AND JOHNSON, M.H. The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured *in vitro*. **Development**,v.113, p.551-560, 1991.

NISHI Y.; TAKESHITA T.; SATO K.; ARAKI T. Change of the mitochondrial distribution in mouse ooplasm during *in vitro* maturation. **J Nippon Med Sch**, v.70, p. 408-15, 2003.

NODA Y. Embryo development *in vitro*. **Assist. Reprod. Rev.** v.2, p.9-15, 1992.

ORSI N. M.; LEESE H. J. Protection against reactive oxygen species during mouse preimplantation embryo development: role of EDTA, oxygen tension, catalase, superoxide dismutase and pyruvate. **Mol Reprod Dev**, v.59, p.44-53, 2001.

PANDEY A. N.; TRIPATHI A.; PREMKUMAR K. V.; SHRIVASTAV T. G.; CHAUBE S. K. Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes. **J Cell Biochem**, v. 111, p.521–528, 2010.

PARRISH J.J.; SUSKO-PARRISH J.; WINER M. A.; FIRST N. L. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biol. Reprod.** v.38, p. 1171–88, 1988.

PEREIRA R. M. AND MARQUES C. C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell and Tissue Banking**, v.9, p.267– 277, 2008.

PELLEGRINO C. A. G.; MOROTTI F.; UNTURA R. M.; PONTES J. H. F.; CAMPOLINA J. P.; SENEDA M. M.; BARBOSA F. A. BARBOSA F. A.; HENRY M. Use of sexed sorted semen for fixed-time artificial insemination or fixed-time embryo transfer of *in vitro*–produced embryos in cattle  
**DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.010>**, 2016.

PONTES, JHF, NONATO-JUNIOR, I., SANCHES, BV, ERENO-JUNIOR, JC, UVO, S., BARREIROS, TRR et al, Comparação de rendimento de embrião e taxa de gravidez entre *in vivo* e *in vitro* no mesmo Nelore (*Bos indicus*) vacas doadoras. **Theriogenology**, v.71, p.690-697, 2009.

PRIBENSZKY C.; LIN L.; DU Y.; LOSONCZI E.; DINNYES A.; VAJTA G. Controlled Stress Improves Oocyte Performance - Cell Preconditioning in Assisted Reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.197–206, 2012.

RIZOS, D., GUTIE´RREZ-ADA´N, A., PE´REZ-GARNELO, S., DE LA FUENTE, J., BOLAND, M. P., AND LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance and messenger RNA expression. **Biol. Reprod.**,v.68, p. 236–243, 2003.

RUSSELL F. D.; BAQIR S.; BORDIGNON J.; BETTS D.H. The Impact of Oocyte Maturation Media on Early Bovine Embryonic Development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 1255-1270, 2006.

SABATINI, L.; WILSON, C.; LOWER, A.; et al. Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing *in vitro* fertilization. **Fertil. Steril.**, v.72, p.1027-1034, 1999.

SHIRAZI A.; ARDALI M. A.; AHMADI E.; NAZARI H.; MAMUEE M.; HEIDARI B. O Efeito da macromolécula Fonte e tipo de mídia Durante a maturação *in vitro* de ovelhas Oócitos sobre o desenvolvimento embrionário subsequente. **J Reprod infértil**, v.13, p. 13-9, 2012.

SILVA L. K.; REIS A. N.; SILVA A. O. A.; SOUSA J. S.; SOUZA A. J. O.; VALE W. G. Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação por diferentes períodos de tempo sem controle da atmosfera gasosa. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.63, p.74-80, 2011.

THORPE G. W., REODICA M., DAVIES M. J.; HEEREN G.; JAROLIM S., PILLAYA B., BREITENBACHD M., HIGGINS V. J.; DAWESA I. W. SUPEROXIDE RADICALS have a protective role during H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. **Molecular Biology of the Cell** 2876-2884, 2013.

ULLOA CMU, YOSHIZAWA M, YAMASHITA A, HAMA S, MITSUI A, HASHI C, ABE H, HOSHI H, FUKUI E, MATSUMOTO H. Blastocyst Production from In Vitro-produced Day-2 Bovine Embryos Classified by Cleavage Stage, and Cytogenetical Evaluation of the Resultant Day-8 Blastocysts. **Journal of Reproduction and Development**,v. 54, p.465-472, 2008.

VAN BLERKON J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. **Mitochondrion**, v.11, n.797-813, 2011.

WRIGHT J. M. Apêndice D. Ilustrações fotográficas do estágio de desenvolvimento embrionário e códigos de qualidade. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**, 4ª Edição, p. 165-168, 2009.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A suplementação do meio de transporte com bloqueadores da meiose, diferentes macromoléculas e antioxidantes teve como objetivo melhorar a qualidade dos oócitos submetidos ao transporte, de modo a influenciar positivamente no desenvolvimento embrionário e criotolerância dos embriões.

Os moduladores de AMPc, forcolina e IBMX, foram utilizados com o objetivo de bloquear a meiose e fornecer tempo adicional para a capacitação do oócito. Neste trabalho a associação da forscolina e do IBMX foi eficiente em bloquear a meiose temporariamente, e foi possível otimizar o período de transporte. Entretanto não houve aumento nas taxas de clivagem, blastócitos e re-expansão dos embriões.

A associação de antioxidantes intra- (cisteína e cisteamina) e extra-celulares (catalase) foi utilizada durante o transporte e na MIV, com intuito de diminuir a concentração intracelular de ROS nos oócitos. Porém a mistura e a dose dos antioxidantes utilizados foram eficientes apenas quando utilizados durante o transporte, onde as condições de cultivo eram sub-ótimas. Não sendo evidenciada sua eficácia quando os foram avaliados a concentração intracelular de ROS ao fim da MIV.

A suplementação do meio de transporte com fontes proteicas, SFB ou BSA não influenciou a qualidade oocitária, desenvolvimento embrionário e a criotolerância. Possivelmente porque o período de utilização foi muito curto, não sendo evidenciadas diferenças na qualidade dos oócitos submetidos ao transporte com SFB ou BSA.

O transporte dos oócitos acelerou a meiose, assim sendo a suplementação do meio de transporte com bloqueadores da meiose pode ser uma alternativa para otimizar este período. É essencial a realização de pesquisas voltadas ao transporte de oócitos bovinos, pois quanto menor o estresse dos oócitos durante este período, melhor será a qualidade oocitária, desenvolvimento embrionário e criotolerância.