

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 06/06/2017.

**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^a 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
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
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
CAPÍTULO 2 – SUPLEMENTAÇÃO COM MODULADORES DE AMP_c E ANTIOXIDANTES DURANTE O TRANSPORTE DE OÓCITOS BOVINOS E SEUS EFEITOS NA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	23
Resumo.....	23
Introdução.....	26
Material e métodos.....	28
Reagentes químicos.....	28
Obtenção e seleção de oócitos.....	29
Simulação de transporte.....	29

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

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>	63
Resumo	63
Introdução	63
Material e métodos	68
Reagentes químicos	68
Obtenção e seleção de oócitos	68
Simulação de transporte	69
Maturação <i>in vitro</i>	69
Avaliação da maturação nuclear	70
Avaliação da distribuição citoplasmática das mitocôndrias e potencial de membrana mitocondrial	71

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

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
Tabela 5 – 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
Tabela 6 – 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
Tabela 7- 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
Tabela 8- 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
Tabela 9 - 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
Tabela 10 - 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
Tabela 11- 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_c E ANTIOXIDANTES DURANTE O TRANSPORTE DE OÓCITOS BOVINOS E SEUS EFEITOS NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

- Figura 1** - Esquema representativo do delineamento experimental36
- 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 antioxidantes42
- 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 antioxidantes48

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 experimental75

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 antioxidantes83

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 antioxidantes89

LISTA DE ABREVIATURAS

- A** – ausente
- A I** – 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
- CO₂** – 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
- H₂DCFDA** - 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 CO₂ 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% CO₂ 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 & NARSEFAHANI, 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 melhorar a qualidade dos oócitos e o subsequente desenvolvimento embrionário, assim como diminuir a concentração intracelular das ROS.

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 6DMP 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.

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 utilizado durante o transporte, onde as condições cultivos 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 da 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.