

ALEXANDRE WOLF

**Estímulo da síntese de glutathione na maturação
in vitro de oócitos bovinos e sua influência no
desenvolvimento embrionário**

Botucatu

2005

ALEXANDRE WOLF

**Estímulo da síntese de glutathiona na maturação
in vitro de oócitos bovinos e sua influência no
desenvolvimento embrionário**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia, Universidade
Estadual Paulista, UNESP, Câmpus de
Botucatu, para a obtenção do título de Doutor
em Medicina Veterinária

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia

Botucatu

2005

Dedico,

Aos meus pais **José e Maria de Lourdes**, que com simplicidade e sabedoria me orientaram a iniciar o caminho da vida e, principalmente, me ensinaram a pular as pedras e a me levantar dos tropeços desta caminhada.

À minha esposa e companheira **Sandra Helena Gabaldi Wolf**, que com sabedoria e dedicação sabe que o conjunto de nós proporciona ganhos espetaculares, pessoal, profissional e espiritual. Ao seu incentivo e apoio, dedico.

Aos meus irmãos **Célia Cristina, Marcos e Adriana**, cunhados **Arnaldo, Leila e Jorge Tadeu** e, sobrinhos **Jéssica Helena e Lucas Fernando, Ana Paula e Ana Vitória**, que a saudade e carinho me fazem acelerar o tempo para o reencontro.

Aos meus tios **Josefa, Antônio Carlos e Aracy, Cláudio e Iza, José Inácio e Denise**, pelo incentivo constante desde o início de minha caminhada.

“**In memorian**”, aos meus avós **Victório e Izabel, Augusto e Tereza Cristina** e aos meus tios **Antônio, Tereza e Luis**, que de uma forma especial me guiam neste caminho.

À **Dona Lola** pelas orientações no caminhar da vida em todos os momentos de decisão.

À **Deus** pela oportunidade de estar neste caminho e ter coragem de continuar, pois a tua infinita bondade me concede sabedoria, força, determinação e me faz trilhar o caminho perfeito. A Ele seja toda a glória, a honra e o louvor!

Aos **animais e embriões**, que na forma mais nobre, doando sua própria existência, foram os principais instrumentos desta etapa de minha vida, pois sem eles, nada disto seria possível e a **CIÊNCIA** não teria dado mais um passo.

E, às **pedras** desta caminhada, que me ensinaram que o importante não é cair, mas sim ser auxiliado a se levantar por uma mão estendida.

...com muito carinho.

Agradecimentos

Especialmente, ao meu “**mestre com carinho**” **Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia**, exemplo de cientista dedicado à pesquisa e ao ensino. Soube de maneira sábia e peculiar transmitir conhecimentos e experiência valiosos, responsáveis pela minha formação como pesquisador. Pelo incentivo e confiança depositados neste trabalho e, sobretudo, por estar sempre perto para compartilhar todo seu conhecimento, encaminhando-me para a pesquisa, meus sinceros agradecimentos.

À **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Câmpus de Jaboticabal** pelo acolhimento e ambiente de trabalho, e à **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Câmpus de Botucatu** pela oportunidade da realização do Doutorado.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da Bolsa de Estudos e pelo investimento financeiro deste trabalho.

Ao colega **Felipe Perecin**, pelas orientações estatísticas e análise dos resultados.

À colega **Karina Beloti Avelino**, pelas idéias e auxílio nas técnicas deste experimento.

À colega **Érika da S. C. Morani**, pela ajuda na dosagem de glutatona.

À **Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti** e à colega **Letícia de Sá Barreto**, por ceder o kit TUNEL para a detecção de apoptose.

Ao **Prof. Dr. César Roberto Esper**, pelas orientações e oportunidades profissionais.

Ao amigo **Rodrigo Sanches**, pelo auxílio sempre presente, com conselhos profissionais de educador e na minha estadia provisória em Jaboticabal.

Aos funcionários **Roberta Vantini**, **Ivo Luiz de Almeida Jr.** e **Paulo Sérgio da Silva**, pela ajuda na obtenção dos ovários e oócitos bovinos para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os **amigos da pós-graduação de Jaboticabal**: Karina Beloti Avelino, Felipe Perecin, Christina Ramires Ferreira, Tânia Vasconcelos Cavalcante, Max Vitória Rezende, Gabriel Sori, Simone Cristina Méo, Elda, Mabel, Viviani Sgobbi Castro, Éric Castro, Andréa Cristina Basso, Naiara e Letícia, **e de Botucatu**: Diônes Oliveira Santos, Andrey Borges, Luiz W. O. Souza, Anee Valeria Mendonça Stachissini, Fabiola Almeida de Carvalho, Fabiana de Souza e Maria Isabel Mello Martins, pela companhia nas disciplinas e pelo convívio no ambiente de trabalho e amizade. Pois amigo é aquele que chega quando todos já se foram.

À secretária da Reprodução Animal, **Isabel Aparecida Penariol Natarelli**, pela ajuda nos assuntos burocráticos e agradável convívio.

À **Denise A. Fioravante Garcia** da seção de Pós-Graduação, pelas orientações burocráticas, com muita dedicação e prontidão em ajudar, principalmente nas urgências.

A todos os **professores e colegas** dos Departamentos de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária (FMVZ-UNESP-Botucatu) e de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal (FCAV-UNESP-Jaboticabal), e **estagiários**, pelo auxílio, convívio e amizade.

Enfim, a todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram com o constante incentivo, apoio e fortaleza nas horas difíceis, para que uma idéia se tornasse realidade.

agradeço de coração.

Mensagens,

“Há entre o homem e o tempo contradições bem fatais: o homem não faz e diz, o tempo não diz e faz.” (Anônimo) Pois, “não é por termos vivido um certo número de anos que envelhecemos; envelhecemos porque abandonamos nossos ideais.” (General Mac Arthur)

“Quem recebe um benefício não deve esquecê-lo; quem o faz não deve lembrá-lo.” (Charron)

“Quando se busca o cume de uma montanha, não se dá importância às pedras do caminho.” (Anônimo) Pois, “não importa quantos passos se dá para trás, mas quantos se dará para frente.” (Décio Melhem)

“Semeie um pensamento e colha um ato; semeie um ato e colha um hábito; semeie um hábito e colha um caráter; semeie um caráter e colha um destino.” (M. Lawense) Pois, “cada etapa alcançada é um ciclo e dores vencidas e de perfeição conquistada.” (André Luiz)

“Você só sente saudade quando percebe que tudo o que você fez valeu a pena.” (Anônimo)

RESUMO

WOLF, A. **Estímulo da síntese de glutathione na maturação *in vitro* de oócitos bovinos e sua influência no desenvolvimento embrionário.** [Stimulation of glutathione synthesis in bovine oocytes during *in vitro* maturation and its influence on embryonic development.]. 2005. 101 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, 2005.

As biotecnologias mais avançadas utilizam a produção *in vitro* (PIV) de embriões como suporte, a qual é dividida em três etapas igualmente importantes: maturação (MIV), fecundação (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV). O objetivo deste trabalho foi avaliar a MIV de oócitos bovinos na presença de estimuladores da síntese de glutathione (GSH) e sua influência no número e na qualidade dos embriões CIV em dois sistemas de cultivo. O meio TCM-199 adicionado de bicarbonato de sódio (26mM), piruvato (0,25mM), sulfato de amicacina (75µg/mL), FSH (0,5µg/mL), hCG (100UI/mL) e estradiol 17β (1µg/ml) foi utilizado como meio base (TCM-199b) para os seis meios de maturação avaliados (Experimento I): controle do laboratório (S) (TCM-199b+10% SFB), controle BSA (B) (TCM-199b+0,5% BSA) e aditivos, cisteína (BC) (meio B+825mM de L-cisteína), cisteína-cisteamina (BCC) (meio BC+100mM de cisteamina), cisteína-cisteamina-mistura de insulina, transferrina e selênio (BCCI) (meio BCC+ITS 8:8:8) e cisteína-ITS (BCI) (meio BC+ITS). Para se verificar a maturação nuclear, pelo estágio da meiose, e a citoplasmática, pelos parâmetros da migração dos grânulos corticais (GCs) para a periferia da membrana citoplasmática (n=1084) e da concentração intracelular de GSH ([GSHi]) (n=1020) foram utilizados oócitos (n=2104) de abatedouro MIV por 24h em estufa úmida a 38,5°C e 5% de CO₂ em ar. Após esta avaliação, oócitos (n=3403) foram maturados no meio S, BC ou BCC, FIV em meio TALP-FIV e CIV, por sete dias, em dois sistemas (SOFaa+2,5% de SFB+0,5% de BSA e atmosfera com 5% de CO₂ em ar, aproximadamente 20% de O₂, ou SOFaa+0,5% de BSA e atmosfera com 5% de CO₂ e 5% de O₂) para a avaliação das taxas de clivagem e produção de blastocisto (Bl) e, da qualidade proporcional do número de células da massa celular interna e do trofoblasto (MCI:TF), pela coloração diferencial, e do número de células em apoptose, pela coloração TUNEL (Experimento II). Os Bls produzidos foram classificados em superiores, considerando-se a proporção MCI:TF≥1:2 e as médias gerais das células da MCI=24 e do

número total de células em apoptose=10 e, em excelentes, considerando a somatória da média geral de células da MCI=24 e do desvio padrão=12 (MCI+SD=36). No Experimento I, as taxas médias de maturação nuclear e da migração dos GCs para a periferia da membrana citoplasmática não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) entre os grupos, mas a [GSHi] (pmol/oócito) foi maior ($p<0,05$) nos grupos BC (4,25), BCC (4,97) e BCCI (4,42) em relação aos S (1,83), B (2,63) e BCI (2,23). No Experimento II, as taxas médias de clivagem e produção de Bl não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) entre os grupos, mas o sistema de CIV com 5% de O₂ produziu Bls de melhor qualidade MCI:TF, tendo maior número de células na MCI em relação ao com 20% de O₂ (35,09% vs 27,06%, respectivamente), além de apresentar maior frequência de Bls superiores (MCI>24 células=55,28% vs 34,88% e MCI:TF $\geq$ 1:2=58,54% vs 31,78%, respectivamente) e excelentes (MCI $\geq$ 36=51,47% vs 26,67%, respectivamente) independente do meio de MIV. No entanto, o sistema com 5% de O₂ produziu Bls com maior porcentagem de células em apoptose na região da MCI em relação ao sistema com 20% de O₂ (8,13% vs 6,04%, respectivamente), como também no embrião (13,18% vs 10,95%, respectivamente), além de apresentar menor frequência de Bls superiores (37,67% vs 69,41%, respectivamente) independente do meio de MIV. Concluiu-se que: a adição de componentes de thiol no meio de MIV não aumentou as taxas de maturação nuclear e de migração dos GCs em nenhum dos grupos, apesar de elevar a [GSHi] nos grupos BC, BCC e BCCI; a maturação e a estocagem intracelular de GSH foram eventos independentes durante a MIV; os meios de MIV e os sistemas de CIV não interferiram nas taxas de clivagem e produção de Bl; independente do meio de MIV utilizado, o sistema de cultivo com 5% de O₂ produziu embriões com melhor qualidade proporcional MCI:TF, mas com maior quantidade de células em apoptose na região da MCI; há necessidade de se avaliar a capacidade dos embriões PIV nestas condições em promover gestação *in vivo*.

Palavras-chave: glutathiona; cisteína; cisteamina; maturação *in vitro*; atmosfera de O₂; cultivo *in vitro*; bovino.

ABSTRACT

WOLF, A. **Stimulation of glutathione synthesis in bovine oocytes during *in vitro* maturation and its influence on embryonic development.** [Estímulo da síntese de glutathione na maturação *in vitro* de oócitos bovinos e sua influência no desenvolvimento embrionário.]. 2005. 101 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, 2005.

Advanced biotechnology uses *in vitro* production (IVP) embryos as support, that is performed in three stages of similar importance: *in vitro* maturation (IVM), fertilization (IVF) and culture (IVC). The main goal of this experiment was to assess the IVM of bovine oocytes in presence of glutathione (GSH) synthesis stimulates and its influence on quantify and quality of IVC embryos in two culture systems. TCM-199 medium plus sodium bicarbonate (26mM), piruvate (0.25mM), ampicillin sulphate (75µg/mL), FSH (0.5µg/mL), hCG (100UI/mL) and estradiol 17β (1µg/ml) was used as basis medium (TCM-199b) to evaluate six maturation media (Experiment I): laboratory control (S) (TCM-199b+10% SFB), BSA control (B) (TCM-199b+0.5% BSA) and supplementation with cysteine (BC) (B medium+825mM of L-cysteine), cysteine-cysteamine (BCC) (BC medium+100mM of cysteamine), cysteine-cysteamine-insuline, transferrin and selenium mix (BCCI) (BCC medium+ITS 8:8:8) and cysteine-ITS (BCI) (BC medium+ITS). Bovine oocytes (n=2104) obtained from slaughterhouse ovaries were used to verify nuclear maturation, by meiosis stage, and cytoplasmatic maturation, by migration of cortical granules (CG) to cytoplasmatic membrane periphery (n=1084) and by GSH intracellular concentration ([GSHi]) (n=1020), the IVM was during 24h in a humid incubator at 38.5°C and under 5% CO₂ atmosphere. Next, oocytes (n=3404) were matured in S, BC or BCC medium, IVF was in TALP-IVF medium and IVC was in two different systems (SOFaa+2.5% SFB+0.5% BSA and under 5% CO₂ atmosphere, and approximate 20% O₂, or SOFaa+0.5% BSA and under 5% CO₂ and 5% O₂ atmosphere) for a seven day period to evaluate cleavage and blastocyst (Bl) rates, inner cell mass and trophoblast ratio quality (ICM:TE), by differential staining, and apoptotic cell quantify, by TUNEL technique (Experiment II). Produced blastocysts were classify as better, when ICM:TE≥1:2 and ICM average cells=24 and total number of apoptotic cells=10, and as excellent Bl when total of ICM average cells=24 plus standard deviation=12 (ICM+SD=36). In Experiment I, nuclear maturation and CG migration to cytoplasmatic membrane rates were

not show statistical differences ($p>0.05$) among groups, but the [GSHi] (pmol/oocyte) was higher ($p<0.05$) in BC (4.25), BCC (4.97) and BCCI (4.42) groups in comparison to S (1.83), B (2.63) and BCI (2.23) groups. In Experiment II, cleavage and Bl rates were not present statistical differences ($p>0.05$) among groups, 5% O₂ system produced Bl with better ICM:TE, with more cells in ICM in comparison to 20% O₂ (35.09% vs. 27.06%, respectively), moreover, it also resulted in more better quality blastocysts (ICM>24 cells=55.28% vs. 34.88% and ICM:TE $\geq$ 1:2=58.54% vs. 31.78%, respectively) and excellent Bl (ICM $\geq$ 36=51.47% vs. 26.67%, respectively) in any IVM medium. However, 5% O₂ system produced Bl with more apoptotic cells in ICM in comparison to 20% O₂ (8.13% vs. 6.04%, respectively), as well as in embryos (13.18% vs. 10.95%, respectively), furthermore few better Bl (37.67 vs. 69.41%, respectively) in any IVM medium. It is concluded that: addition of thiol components in IVM medium were not increase nuclear maturation and the CG migration rates in any groups, but increased [GSHi] in BC, BCC and BCCI groups; the maturation and GSH intracellular storage were independent events during IVM; IVM media and IVC systems were not interfere in cleavage and Bl rates; in 5% O₂ system produced better embryos (ICM:TE), but with more apoptotic cells in ICM, independent of IVM medium used; there are necessity to evaluate the capacity of IVP embryos in this experiment conditions to promote *in vivo* pregnancy.

Key-words: glutathione; cysteine; cysteamine; *in vitro* maturation; O₂ atmosphere; *in vitro* culture; bovine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura bioquímica da glutathione reduzida (radical –SH) e oxidada (formação de ponte dissulfeto), composta por glutamato, cisteína e glicina.....	26
Figura 2: Esquema resumido da síntese de glutathione e seu mecanismo de ação frente ao peróxido de hidrogênio com formação de H ₂ O (ciclo γ -glutamil).....	27
Figura 3: Curva Padrão de GSH, construída com concentrações conhecidas, utilizada para a conversão de valores lidos no espectrofluorímetro em nm para pmol de GSH.....	41
Figura 4: Oócitos de bovino MIV por 24h.....	51
Figura 5: Porcentagem média de oócitos MIV(maturação nuclear e GCs na periferia), por 24h, em seis meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH.....	52
Figura 6: Concentração média intracelular de GSH por oócito (pmol/oócito $\pm$ SD) de oócitos MIV, por 24h, em seis meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH.....	53
Figura 7: Porcentagem média de clivagem e de produção de blastocisto (sete dias após a FIV) de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH, e CIV dos embriões em dois sistemas de cultivo.....	55
Figura 8: Blastocistos (sete dias após a FIV) avaliados pela técnica de coloração diferencial sob microscopia de epifluorescência.....	56
Figura 9: Porcentagem média de células da MCI e do TF do total de células dos blastocistos produzidos de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH, e CIV dos embriões em dois sistemas de cultivo.....	57
Figura 10: Frequência (%) média de blastocistos de qualidade superior (MCI>24; TF>51; T>75 e MCI:TF $\geq$ 1:2) produzidos de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH, e CIV dos embriões em dois sistemas de cultivo.....	59

Figura 11: Frequência (%) média de blastocistos excelentes ($MCI \geq 36$) dos blastocistos de qualidade superior ou do total de blastocistos produzidos de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH, e CIV do embrião em dois sistemas de cultivo.....	60
Figura 12: Blastocistos (sete dias após a FIV) avaliados pela técnica de coloração TUNEL, sob microscopia de epifluorescência.....	62
Figura 13: Porcentagem média de células em apoptose presentes na MCI dos blastocistos produzidos de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH, e CIV dos embriões em dois sistemas de cultivo.....	64
Figura 14: Porcentagem média de células em apoptose presentes no TF e T dos blastocistos produzidos de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH, e CIV dos embriões em dois sistemas de cultivo.....	64
Figura 15: Número médio total de células em apoptose presentes na MCI e no TF em relação ao tamanho (número médio de células/blastocisto) dos blastocistos produzidos de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH, e CIV dos embriões em dois sistemas de cultivo.....	65
Figura 16: Frequência (%) média de blastocistos de qualidade superior (com menos de dez células em apoptose e blastocistos maiores de 83 células) produzidos de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH, e CIV dos embriões em dois sistemas de cultivo.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número e porcentagem média de oócitos MIV (maturação nuclear e GCs na periferia), por 24h em seis meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH.....	51
Tabela 2: Concentração média intracelular de GSH por oócito (pmol/oócito $\pm$ SD) de oócitos MIV, por 24h em seis meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH.....	53
Tabela 3: Número de oócitos e porcentagem média de clivagem e de produção de blastocisto (sete dias após a FIV) de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH, e CIV dos embriões em dois sistemas de cultivo.....	55
Tabela 4: Número de blastocistos (sete dias após a FIV) e porcentagem média de células da MCI e do TF em relação ao número total de células dos blastocistos produzidos de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH, e CIV dos embriões em dois sistemas de cultivo.....	57
Tabela 5: Frequência (%) média de blastocistos de qualidade superior (MCI>24; TF>51; T>75 e MCI:TF $\geq$ 1:2) produzidos de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH, e CIV dos embriões em dois sistemas de cultivo.....	58
Tabela 6: Frequência (%) média de blastocistos excelentes (MCI $\geq$ 36) dos blastocistos de qualidade superior ou do total de blastocistos produzidos de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH, e CIV dos embriões em dois sistemas de cultivo.....	60
Tabela 7: Número de blastocistos (sete dias após a FIV), porcentagem e número médios de células em apoptose (presentes na MCI, no TF e total) e tamanho (número médio de células/blastocisto) dos blastocistos produzidos de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH, e CIV dos embriões em dois sistemas de cultivo.....	63

Tabela 8: Frequência (%) média de blastocistos de qualidade superior (com menos de dez células em apoptose e blastocistos maiores de 83 células) produzidos de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH, e CIV dos embriões em dois sistemas de cultivo.....	68
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AI/TI =	Anáfase I / telófase I
Bl =	Blastocisto
BSA =	Albumina sérica bovina
°C =	Graus Celsius
CIV =	Cultivo <i>in vitro</i>
CO ₂ =	Dióxido de carbono
COC =	Complexo- <i>cumulus</i> -oócito
DNA =	Ácido desoxirribonucléico
SD =	Desvio padrão
FITC-LCA =	Aglutinina de <i>Lens culinaris</i> conjugada ao isotiocianato de fluoresceína
FIV =	Fecundação <i>in vitro</i>
GCs =	Grânulos corticais
GSH =	Glutationa
γGCS =	Gama- glutamylcisteína-sintetase
GS =	Glutationa sintetase
GSH-RD =	Glutationa redutase
GSH-PX =	Glutationa peroxidase
h =	Hora
LH =	Hormônio luteinizante
ITS =	Insulina + transferrina + selênio
MCI =	Massa celular interna
Meio S =	Meio controle do laboratório: TCM 199 bicarbonato + SFB
Meio B =	Meio controle BSA: TCM 199 bicarbonato + BSA
Meio BC =	Meio com BSA + cisteína
Meio BCC =	Meio com BSA + cisteína + cisteamina
Meio BCCI =	Meio com BSA + cisteína + cisteamina + ITS
Meio BCI =	Meio com BSA + cisteína + ITS
min =	Minuto
MIV =	Maturação <i>in vitro</i>
MII =	Metáfase II
mL =	Mililitro

mm =	Milímetro
mM =	Milimol
n =	Número
ng =	Nanograma
nm =	Nanômetro
O ₂ =	Oxigênio
OPT =	<i>“O-phthaldialdehyde”</i>
PBS =	Tampão salina fosfato
pg =	Picograma
PHE =	Penicilamina, hipotaurina e epinefrina
PIV =	Produção <i>in vitro</i>
pMol =	Picomol
PVP =	Polivinil-pirrolidona
SAS =	<i>“Statistical Analysis System”</i>
SB =	Solução de bloqueio
SEAM =	Solução de extração de ácido meta-fosfórico
SFB =	Soro fetal bovino
SOFaa =	Meio de cultivo <i>“Synthetic Oviduct Fluid”</i> suplementado com aminoácidos
T =	Número total de células do blastocisto
TALP-FIV =	Meio de cultivo Tyrode’s albumina lactato piruvato
TCM-199 =	Meio de cultura para tecidos-199
TdT =	Enzima terminal deoxinucleotidil transferase
TF =	Trofoblasto
TG =	Tampão de glutatona
TUNEL =	<i>In situ terminal deoxinucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay</i>
UI =	Unidade internacional
VGBD =	Quebra da vesícula germinativa
x =	Vezes
μL =	Microlitro
μM =	Micromol
% =	Porcentagem

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Objetivos.....	22
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1 Produção <i>in vitro</i> (PIV) de embriões.....	24
2.2 A biosíntese da glutathione (GSH) e a sua importância no oócito.....	26
2.3 O uso de aditivos em meios de cultivo para a PIV de embriões.....	30
2.4 O ambiente de CIV d embriões.....	33
2.5 Apoptose em células embrionárias.....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Experimento I: Influência da adição de aditivos no meio de maturação <i>in vitro</i> (MIV) de oócitos bovinos.....	37
3.1.1 Obtenção e seleção dos oócitos bovinos.....	37
3.1.2 MIV dos oócitos bovinos.....	38
3.1.3 Avaliação da maturação oocitária.....	39
3.1.4 Mensuração da concentração intracelular de GSH dos oócitos MIV.....	40
3.1.4.1 Construção da Curva Padrão da Concentração de GSH.....	41
3.2 Experimento II: Avaliação do desenvolvimento e da qualidade de embriões produzidos <i>in vitro</i> (PIV), em dois sistemas de cultivo, com oócitos bovinos MIV na presença de componentes de thiol.....	42
3.2.1 Obtenção e maturação dos oócitos bovinos.....	42
3.2.2 Fecundação <i>in vitro</i> (FIV) dos oócitos bovinos.....	42
3.2.3 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV) dos embriões bovinos.....	43
3.2.4 Quantificação das taxas de clivagem e de desenvolvimento dos embriões CIV.....	44

3.2.5	Verificação da qualidade proporcional do número de células da MCI e do TF nos embriões CIV.....	44
3.2.5.1	Determinação diferencial do número de células da MCI e do TF.....	44
3.2.6	Avaliação do número de células em apoptose dos embriões CIV.....	45
3.2.6.1	Determinação do número de células com DNA fragmentado na MCI e no TF.....	45
3.3	Delineamento experimental.....	47
3.4	Análise estatística.....	48
4	RESULTADOS.....	50
4.1	Experimento I: Influência da adição de aditivos no meio de maturação <i>in vitro</i> (MIV) de oócitos bovinos.....	50
4.1.1	Avaliação da maturação oocitária.....	50
4.1.2	Mensuração da concentração intracelular de GSH dos oócitos MIV.....	52
4.2	Experimento II: Avaliação do desenvolvimento e da qualidade de embriões produzidos <i>in vitro</i> (PIV), em dois sistemas de cultivo, com oócitos bovinos MIV na presença de componentes de thiol.....	54
4.2.1	Quantificação das taxas de clivagem e de desenvolvimento dos embriões CIV.....	54
4.2.2	Verificação da qualidade proporcional do número de células da MCI e do TF nos embriões CIV.....	56
4.2.3	Avaliação do número de células em apoptose dos embriões CIV.....	61
5	DISCUSSÃO.....	69
5.1	Experimento I: Influência da adição de aditivos no meio de maturação <i>in vitro</i> (MIV) de oócitos bovinos.....	69
5.1.1	Avaliação da maturação oocitária.....	69
5.1.2	Mensuração da concentração intracelular de GSH dos oócitos MIV.....	70
5.2	Experimento II: Avaliação do desenvolvimento e da qualidade de embriões produzidos <i>in vitro</i> (PIV), em dois sistemas de cultivo, com oócitos bovinos MIV na presença de componentes de thiol.....	73
5.2.1	Quantificação das taxas de clivagem e de desenvolvimento dos embriões CIV.....	73

5.2.2	Verificação da qualidade proporcional do número de células da MCI e do TF nos embriões CIV.....	75
5.2.3	Avaliação do número de células em apoptose dos embriões CIV.....	77
6	CONCLUSÕES.....	81
7	REFERÊNCIAS.....	83
	ANEXOS.....	96

Introdução

1 INTRODUÇÃO

As biotécnicas utilizadas na reprodução animal foram revolucionadas em menos de 30 anos, principalmente na década de 90 com a clonagem e a transgenia. No entanto, essas biotécnicas avançadas são totalmente dependentes da tecnologia básica da produção *in vitro* (PIV) de embriões.

Portanto, pesquisas na área de maturação (MIV), fertilização (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) de embriões são muito importantes, dando suporte para as outras biotecnologias. Sabe-se atualmente que somente 30% dos oócitos submetidos à MIV são capazes de produzir embriões em contraste aos 90% dos embriões produzidos totalmente *in vivo*.

A maturação de oócitos pode ser realizada *in vitro*, embora não apresente a mesma eficiência que a *in vivo*. Entretanto, é uma das fases mais importantes da PIV de embriões, pois é o período em que o oócito adquire capacidade de seguir os próximos eventos (FIV e CIV). Além disso, o oócito produz reservas bioquímicas, para manter o desenvolvimento inicial até a transição materno-zigótica (ativação dos genes do embrião), e enzimáticas, para suportar o estresse oxidativo sofrido, principalmente, durante a compactação da mórula, onde há maior gasto energético.

Embora a maturação nuclear possa ocorrer espontaneamente, a citoplasmática freqüentemente é ineficiente, ocorrendo uma migração inadequada de grânulos corticais para a periferia da membrana citoplasmática do oócito (Damiani et al., 1996) e uma estocagem insuficiente de glutathione (GSH) intracelular (De Matos et al., 1996), levando à possibilidade de polispermia e de baixa competência oocitária para posterior desenvolvimento embrionário.

Este trabalho foi proposto devido a uma divergência na literatura quanto à adição de componentes de thiol somente no meio de MIV de oócitos bovinos para se elevar a produção e/ou a qualidade de embriões PIV e, a ausência de relato da MIV com estes componentes e subsequente CIV pós-FIV nos dois sistemas de cultivo (sistema com 5% ou 20% de O₂).

Portanto, apresenta-se a hipótese de que o estímulo da GSH intracelular no oócito bovino, durante a MIV, suporta a maturação na ausência do SFB. Ainda, o subsequente CIV destes oócitos no sistema com 5% de O₂ aumenta a PIV de embriões bovinos, quanto a sua quantidade (taxas de clivagem e de produção de blastocisto) e qualidade (maior número de células constituintes do embrião e menor número de células em apoptose).

1.1 Objetivos

- Verificar se a adição de componentes de thiol no meio de MIV aumenta as taxas de maturação oocitária;
- Avaliar se a adição de componentes de thiol no meio de MIV é capaz de elevar a concentração intracelular de GSH no oócito bovino;
- Observar se a presença de componentes de thiol durante a MIV de oócitos bovinos elevam as taxas de clivagem e de produção de blastocisto, bem como melhora a qualidade dos embriões PIV, com relação ao número diferencial de células (massa celular interna e trofoblasto) e ao número de células em apoptose;
- Avaliar a influência de dois sistemas de CIV de embriões, produzidos com oócitos MIV na presença de precursores da GSH, sobre as taxas de clivagem e de produção de blastocisto, bem como sua qualidade proporcional MCI:TF e número de células em apoptose.

*Revisão da
Literatura*

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Produção *in vitro* (PIV) de embriões

Um dos objetivos da produção *in vitro* (PIV) de embriões é aumentar o número de embriões produzidos e que estes mantenham a capacidade de serem gestados após a transferência para receptoras. A PIV de embriões é altamente variável (20 a 40%), tendo a necessidade de melhorar e estabilizar estes índices, adequando a técnica em suas três etapas: maturação (MIV), fecundação (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) de embriões (Caamaño et al., 1998).

O processo de maturação oocitária pode ser realizado *in vitro* com a remoção do oócito imaturo do folículo e seu cultivo em meio e ambiente adequados (Edwards, 1965 apud Abeydeera et al., 1998). Embora a simples remoção do oócito do folículo já induza sua maturação nuclear espontânea, não há completa aquisição de competência de desenvolvimento, devido às falhas na maturação citoplasmática (Tribaut, 1977 apud Abeydeera et al., 1998).

O sistema de PIV de embriões é menos eficiente em relação ao *in vivo*, apresentando menor taxa de clivagem e de produção de blastocisto, bem como menor qualidade embrionária (Van Soom et al., 1997). Esta baixa qualidade de embriões PIV pode ser atribuída ao menor número de células viáveis (menor número de células constituintes do embrião e maior incidência de células em apoptose) da massa celular interna (MCI), onde uma fragmentação do DNA pode iniciar antes do embrião completar o quarto ciclo celular (8 a 16 células) (Knijn et al., 2003). Desta forma, fica clara a importância dos cuidados técnicos no período de MIV, de FIV e de CIV nos primeiros ciclos celulares. Entretanto, Krisher & Bavister (1998) sugeriram que, para aumentar a viabilidade dos embriões CIV, maior atenção deve ser dada principalmente à MIV, pois as condições de cultivo *in vitro* podem influenciar a maturação citoplasmática dos oócitos.

Da mesma forma, Long et al. (1999) previamente descreveram que as condições de cultivo, como as diferentes composições dos meios e a variação da qualidade espermática, têm impacto significativo sobre a produção de embriões, por interferir diretamente na FIV e no CIV de embriões (clivagem e produção embrionária). A partir destas observações, as condições de MIV vêm sendo muito estudadas para se aproximar ao que ocorre

fisiologicamente (*in vivo*), o que dará ao oócito competência para suportar os próximos eventos, pois a maturação oocitária corresponde a um fenômeno onde o gameta feminino adquire competência de conduzir e passar pelos eventos da fecundação e do desenvolvimento embrionário inicial (Abeydeera et al., 1998).

A maturação citoplasmática pode ser avaliada por uma série de parâmetros, tais como alterações estruturais com a redistribuição das organelas citoplasmáticas (grânulos corticais, mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático). Um dos parâmetros mais utilizados para esta avaliação é a migração dos grânulos corticais (GCs) para a periferia do oócito (Damiani et al., 1996; Carneiro et al., 2002); outro parâmetro é a dosagem de glutathione (GSH) intracelular (De Matos et al., 1995, 1996).

No desenvolvimento inicial (quinto ao sexto ciclo celular) as células embrionárias se diferenciam em massa celular interna (MCI) ou trofoblasto (TF); a MCI originará principalmente o feto, enquanto o TF dará origem às membranas extra-embrionárias (Neuber et al., 2002). A qualidade embrionária pode ser avaliada pela coloração diferencial, descrita por Iwasaki et al. (1990), onde se pode quantificar as células da MCI e do TF. O estabelecimento de uma correlação da proporção de MCI:TF é considerada essencial para assegurar a viabilidade embrionária (Fleming, 1987). Embora, não seja determinada uma razão ideal de MCI:TF, tem-se adotado valores de 1:2 (Avelino, 2004).

No metabolismo celular, durante o desenvolvimento embrionário, as espécies reativas de oxigênio (ROS), que incluem ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH), são constantemente liberadas do processo de quebra de ATP (fonte energética celular) (Feugang et al., 2004).

Estes radicais livres são os mais importantes oxidantes biológicos, pois são potentes eletrófilos que agem em centros nucleofílicos, com terminações $-OH$, $-NH_2$ e grupos $-SH$, de pequenos componentes e macromoléculas celulares (DNA, proteínas e polissacarídeos), causando consequências irreversíveis, como a morte celular (apoptose ou necrose) (Knapen, et al., 1999). A concentração intracelular das ROS é aumentada nos sistemas de cultivo *in vitro*, onde elevadas quantidades de O_2^- e H_2O_2 foram detectadas (Feugang et al., 2004).

Para regular a ação destas ROS, a célula possui um sistema antioxidante eficiente, como superóxido dismutase (SOD), catalase e GSH, que atuam como reguladores metabólicos, atenuando os efeitos do estresse oxidativo por inativar as ROS (De Matos et al., 1995, 2002a).

2.2 A biosíntese da glutathiona (GSH) e a sua importância no oócito

A GSH (tripeptídeo tiol L- γ -glutamyl-L-cisteinyl-glicina) é formada pelos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina (Figura 1) e apresenta a terminação –SH (tiol). Esta terminação é importante durante as reações de óxido-redução para remover os peróxidos, agindo diretamente nas ROS (O_2^- , OH^- e H_2O_2) (Knapen et al., 1999), resultando em GSH oxidada (GSSG) (Hall, 1999). Além disso, é um tiol de baixo peso molecular e é o principal componente sulfidril não protéico presente em grandes quantidades nas células animais e vegetais, tendo um papel importante na proteção celular ao dano oxidativo (Abeydeera et al., 1998, 1999). Apresenta-se de duas formas: reduzida, como um grupo sulfidril (GSH), predominante (99,5%) na célula, ou oxidada, como um dissulfeto (GSSH) (Anderson, 1985) (Figura 1).

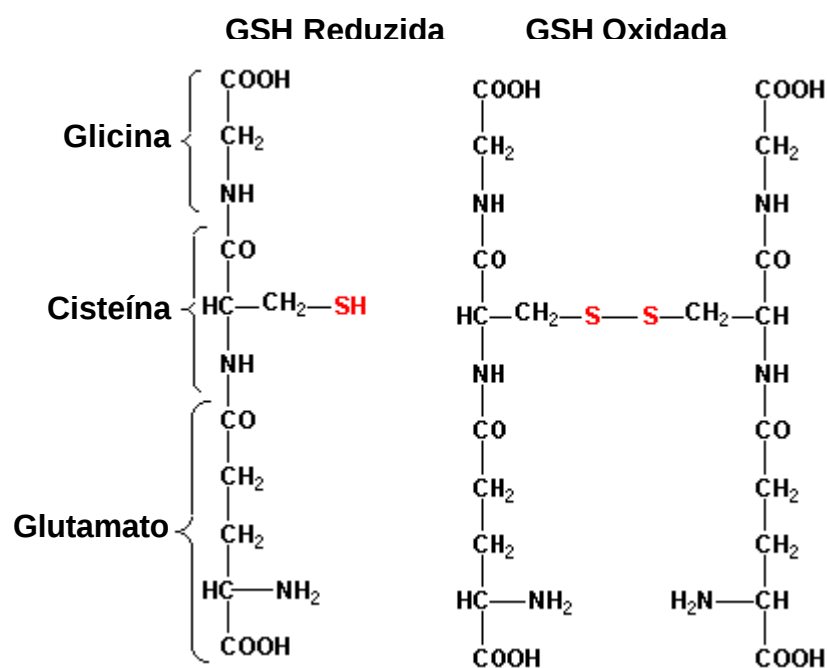


Figura 1: Estrutura bioquímica da glutathiona reduzida (radical –SH) e oxidada (formação de ponte dissulfeto), composta por glutamato, cisteína e glicina. Fonte: (Avelino, 2004)

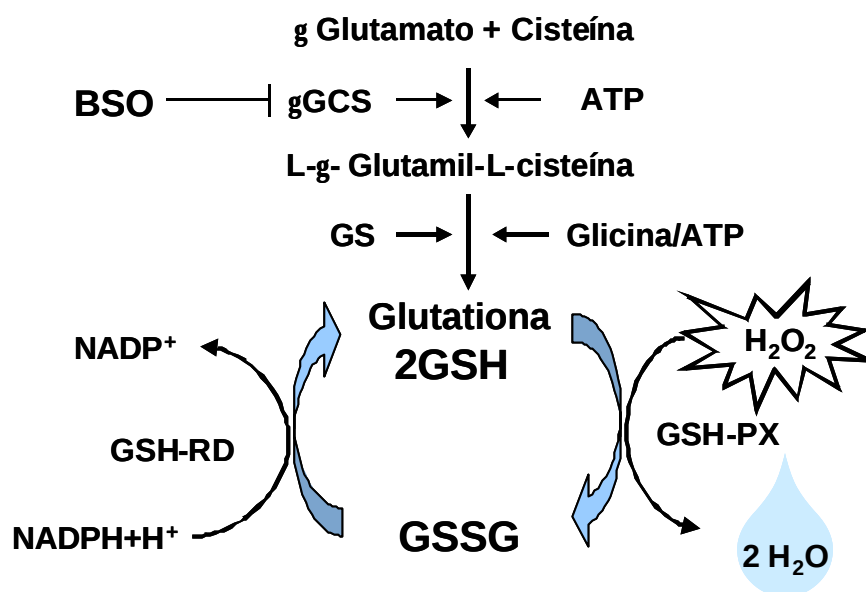


Figura 2: Esquema resumido da síntese de glutatona e seu mecanismo de ação frente ao peróxido de hidrogênio com formação de H₂O (ciclo γ -glutamil).

γ GCS = gama-glutamilcisteína-sintetase, GS = glutaciona sintetase,

GSH = glutaciona reduzida, GSSG = glutaciona oxidada, GSH-RD = glutaciona redutase, GSH-PX = glutaciona peroxidase, BSO = buthionine sulfoximine,

NADP = nicotinamida adenina dinucleotídeo fostato. Fonte: (Avelino, 2004)

A síntese e a oxidação da GSH nas células ocorre no ciclo γ -glutamil, que tem, por sua vez, duas funções principais: sintetizar e manter a GSH na forma reduzida e transportar aminoácidos pela membrana celular (Meister, 1983).

Para neutralizar as ROS, duas moléculas de GSH, com radicais –SH, reagem pelo mecanismo de redução, via NADPH, com uma molécula de H₂O₂, formando GSSG (metabólito tóxico) e duas moléculas de H₂O. A conversão de GSSG para GSH é imediatamente catalisada pela enzima glutaciona redutase, utilizando NADH ou NADPH como doador de elétrons (redutor intracelular), mantendo uma proporção GSH/GSSG em torno de 99:1 dentro da célula (Figura 2) (Meister, 1983; Hall, 1999).

Além de proteção celular contra radicais livres gerados normalmente pelo metabolismo oxidativo da célula, a GSH apresenta várias ações, como o transporte de aminoácidos, principalmente da cisteína, síntese protéica e de DNA e redução de dissulfetos (Meister, 1983; Nagai et al., 2001; De Matos et al., 2002a). Ainda, a GSH é requerida para a desintoxicação de peróxidos lipídicos e de proteínas tioladas, controla a permeabilidade da membrana

mitocondrial e, ainda, pode estar envolvida na remoção de H_2O_2 em embriões (Hall, 1999; Van Soom et al., 2002).

Apesar da GSH ser constituída por glutamato, glicina e cisteína, sua biosíntese no oócito é limitada pela presença de L-cisteína no meio extracelular (Furnus & De Matos, 1999), mas a cisteína é muito instável e rapidamente oxidada (autooxidação) à cistina em uma hora de cultivo, ficando indisponível para as células e prejudicando a síntese de GSH intracelular (Bannai, 1984 apud De Matos et al., 1995; Sagara et al., 1993). No entanto, componentes de tiol, como o β -mercaptoetanol ou a cisteamina (precursores da GSH), reduzem a cistina em cisteína (substratos da GSH e também componentes de tiol), mantendo assim sua concentração e disponibilidade no meio de cultura (Ishii et al., 1981; Issels et al., 1988). Portanto, a disponibilidade de aminoácidos precursores é o fator regulador na síntese de GSH, onde o suprimento extra celular de aminoácidos promove um ponto de controle nas células de mamíferos (Bannai, 1984 apud De Matos et al., 1995; Sagara et al., 1993). Desta forma, a adição de componentes de tiol no meio de cultivo, como o β -mercaptoetanol, a cisteamina e/ou a cisteína, intensifica a síntese e aumenta a concentração intracelular de GSH (Issels et al., 1988; Takahashi et al., 1993, 2002).

A importância da síntese de GSH durante a maturação oocitária *in vivo* foi relatada em várias espécies: camundongos (Calvin et al., 1986), hamsters (Perreauld et al., 1988), suínos (Yoshida et al., 1993; Abeydeera et al., 1998; Jeong & Yang, 2001; Brad et al., 2003), bovinos (Takahashi et al., 1993; De Matos et al., 1995, 1996; De Matos & Furnus, 2000), búfalos (Gasparrini et al., 2000, 2003), ovinos (De Matos et al., 2002b) e caprinos (Rodríguez-González et al., 2003), e o aumento de sua concentração foi relacionado com o desenvolvimento e a maturação oocitária no ovário, principalmente na proximidade do tempo da ovulação, e ao pico de LH, fazendo um estoque para proteger o oócito durante e após a fecundação (Perreauld et al., 1988).

Os fluidos do sistema genital apresentam alta concentração de GSH no período pré-ovulatório, dentre eles, o líquido folicular (Bisseling et al., 1997) e o fluido do oviduto (Lapointe & Bilodeau, 2003). A concentração de GSH é quatro vezes maior no fluido do oviduto bovino no período pré-ovulatório que na fase luteal (Lapointe & Bilodeau, 2003).

A síntese e o metabolismo de GSH intracelular podem ser regulados pelas gonadotrofinas durante a maturação oocitária (Zuelke et al., 2003) e as células do *cumulus oophorus* são importantes neste processo, com o transporte de cisteína para o interior do oócito, pois experimentos mostraram que a adição de precursores de GSH durante a MIV estimulou a síntese de GSH apenas em oócitos envolvidos pelas células da granulosa, mas não

nos desnudos (De Matos et al., 1997; Nagai, 2001). Ainda, Wang et al. (1997) associaram o aumento da exocitose dos grânulos corticais em oócitos suínos maturados na presença da cisteína.

No entanto, uma presença balanceada de ROS e antioxidantes tem um impacto positivo nas funções do espermatozóide, MIV, FIV e CIV de embriões bovinos, onde o oviduto promove um ótimo ambiente para que ocorra a maturação final do oócito, fusão dos gametas e o desenvolvimento embrionário inicial. Em alguns casos, os efeitos das ROS sobre as funções do espermatozóide são benéficos (ligação do espermatozóide à zona pelúcida), mas maléficos em outros (motilidade) (Lapointe & Bilodeau, 2003).

A concentração intracelular de GSH se eleva durante a maturação oocitária e o seu nível foi relacionado com a qualidade de maturação oocitária (Yoshida et al., 1993). Yoshida et al. (1993) e Sawai et al. (1997) relataram que a cisteína é importante durante o estágio de metáfase I a metáfase II e para a formação dos pronúcleos em suínos; após a fecundação o nível de GSH intracelular cai ao redor de 10% do inicial, sugerindo que esta enzima seja mais importante durante a fecundação que no desenvolvimento embrionário (Zuelke et al., 2003).

Durante a fecundação, a GSH intracelular participa ativamente na descondensação da cabeça espermática, transformando-a em pronúcleo masculino, manutenção dos fusos e auxilia na ativação oocitária (Calvin et al., 1986; Perreauld et al., 1988; Yoshida et al., 1993). Miyamura et al. (1995) demonstraram que, após a fertilização, a concentração de GSH declina significativamente, refletindo ser um fator regulador da descondensação da cabeça do espermatozóide e da formação do pronúcleo masculino.

Por outro lado, a manutenção de um estado de redução-oxidação (redox) intracelular pelo aumento da concentração de GSH é um fator importante para o desenvolvimento embrionário a blastocisto (Takahashi et al., 1993; De Matos et al., 1995, 1996; Abeydeera et al., 1998).

No período de desenvolvimento embrionário, a GSH está relacionada com a competência embrionária em superar o estresse oxidativo do cultivo *in vitro* (Caamaño et al., 1996; Lim et al., 1996; Luvoni et al., 1996). Em bovinos, o estoque suficiente de GSH durante a maturação oocitária protege o embrião até o estágio de 8 a 16 células, diminuindo drasticamente após a fecundação e, após este estágio, adquire a capacidade de síntese protéica (transição materno-zigótica) (Lim et al., 1996; De Matos et al., 2002a).

Em suma, a síntese e a estocagem da GSH intracelular no oócito, durante a maturação, é importante para a sua competência, auxiliando no processo de fecundação, principalmente na descondensação da cabeça do espermatozóide. No entanto, na FIV a GSH não deve estar no

meio extracelular, pois inibe a ligação dos gametas, processo dependente de ROS. Posteriormente à fecundação, a GSH intracelular restante auxilia no desenvolvimento inicial do embrião, até que ele adquira capacidade de produção de suas próprias proteínas (transição materno-zigótica). Portanto, o estímulo da GSH durante a MIV é importante para que o oócito prepare seu estoque intracelular para enfrentar os processos de FIV e CIV inicial. Embriões com alta concentração intracelular de GSH suportam melhor o estresse oxidativo que ocorre normalmente na PIV.

2.3 O uso de aditivos em meios de cultivo para a PIV de embriões

Para melhorar a maturação citoplasmática são acrescentados alguns componentes no meio de MIV, como: substratos energéticos, fatores de crescimento, aminoácidos (Watson et al., 2000) e estimuladores da síntese de GSH (De Matos et al., 1996, 2002a; Abeydeera et al., 1998; Gasparrini et al., 2000, 2003; Jeong & Yang, 2001; Van Soom et al., 2002; Avelino, 2004), além de outros agentes antioxidantes, como: transferrina, lactoferrina, vitaminas E e C e taurina (Lim & Hansen, 2000).

Na prática da PIV de embriões bovinos, quando componentes de tiol de baixo peso molecular (β -mercaptoetanol, cistina, cisteína e cisteamina) foram adicionados no meio de MIV de oócitos, ocorreu a estimulação da síntese de GSH, reduzindo os níveis de peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) e aumentando a taxa de desenvolvimento *in vitro* de embriões, pois ao melhorar a condição redox intracelular há menor lesão das células embrionárias (apoptose) pelo H_2O_2 , que quebra o DNA (Takahashi et al., 1993; De Matos et al., 1996, 2002a,b; De Matos & Furnus, 2000). Resultados similares foram encontrados em suínos (Abeydeera, et al., 1999), hamsters (Zuelke, 2003) e búfalos (Gasparrini et al., 2000).

Este aumento da GSH intracelular estimulado pelos compostos de tiol durante a MIV permanece elevado durante a FIV, mas diminui drasticamente no cultivo inicial, indicando ser um importante componente para o processo de maturação citoplasmática que afeta os passos subseqüentes da PIV embrionária (De Matos & Furnus, 2000).

Há vários trabalhos que suplementaram o meio de MIV com precursores da síntese de GSH intracelular, como o β -mercaptoetanol, a cisteamina ou a cisteína, nas espécies bovina (De Matos et al., 1996, 2002a; Van Soom et al., 2002; Avelino, 2004), ovina (De Matos et al., 2002b), caprina (Rodríguez-González et al., 2003), bubalina (Gasparrini et al., 2000, 2003) e suína (Abeydeera et al., 1998; Jeong & Yang, 2001), demonstrando que o aumento da síntese

de GSH proporcionou uma maior competência dos oócitos e melhorou a taxa de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (Takahashi et al., 1993; De Matos et al., 1995, 1996, 1997, 2002b; Luvoni et al., 1996; Abeydeera et al. 1998, 1999; De Matos & Furnus, 2000; Nagai, 2001).

De Matos et al. (1995) notaram que ao adicionar cisteamina (0, 25, 50 ou 100 μ M) no meio de MIV de oócitos bovinos, aumentou a concentração intracelular de glutathione nos oócitos maturados, promovendo melhor desenvolvimento de blastocistos no cultivo *in vitro*. Não foram notadas diferenças na MIV, taxa de clivagem e no número médio de células por blastocisto entre o grupo controle e os tratados, porém a concentração intracelular de GSH e a taxa de blastocistos foram superiores no grupo cisteamina a 100 μ M (9,6 μ mol/oócito; 25% de blastocisto) em relação ao controle (4,8 μ mol/oócito; 18% de blastocisto).

Em outro trabalho, De Matos et al. (2002a) maturaram oócitos bovinos por 24h em meio TCM-199 suplementado com hormônios, 10% de soro fetal bovino e cisteamina (0 ou 100 μ M), obtendo, no cultivo *in vitro*, uma melhor taxa de blastocisto nos oócitos maturados com 100 μ M de cisteamina (36%) em relação ao grupo sem cisteamina (25%). Já Gasparrini et al. (2003) obtiveram melhor desenvolvimento embrionário com 50 μ M de cisteamina no meio de MIV de oócitos de búfalos.

Avelino (2004) maturou oócitos bovinos na presença de estimuladores (cisteína, cisteamina ou β -mercaptoetanol) ou inibidor (BSO) da síntese de GSH e observou que os estimuladores aumentam a concentração intracelular de GSH, favorecendo a maturação citoplasmática, mas não interferiu nas taxas de clivagem e de produção embrionária; no entanto, somente a cisteína, associada ou não à cisteamina, aumentou o número de células da MCI e o tamanho do embrião, bem como diminuiu a taxa de apoptose nas células embrionárias.

Componentes de thiol como a cisteína, a cistina e a cisteamina e outros antioxidantes podem ser utilizados durante a maturação oocitária ou no cultivo embrionário para prevenir os danos causados por espécies reativas de oxigênio ao embrião, melhorando sua PIV (Takahashi et al., 1993; De Matos et al., 1995, 1997; Caamaño et al., 1998; Van Soom et al., 2002). Por outro lado, Ali et al. (2003) relataram que a adição de antioxidantes nos meios só foi benéfica durante a MIV dos oócitos, já que observaram que se adicionar antioxidantes durante a FIV ou o CIV há efeito negativo sobre a produção embrionária. Desta forma, ressaltaram que o requerimento antioxidante para oócitos bovinos varia durante a MIV, a FIV e o CIV para a

PIV de embriões bovinos, provavelmente porque certos níveis de ROS são necessários para a capacitação espermática no meio e para a fusão entre gametas.

Apesar do estímulo à síntese de GSH intracelular em oócitos ou embriões PIV com a utilização de componentes de thiol no meio, sua concentração fica abaixo da contida no oócito maturado *in vivo* (Abeydeera et al., 1999; Avelino, 2004).

Outros aditivos como a insulina melhoram o desenvolvimento embrionário de mamíferos pré-implantação, pelo controle do transporte da glicose, e exercem ações mitogênicas e anti-apoptóticas, pois o transporte deste substrato de energia é essencial para a sobrevivência do embrião (Augustin et al., 2003); além disso, estimulam também o transporte de aminoácidos pela membrana celular do embrião (McGowan et al., 1995) e aumentam a síntese de proteína (Lewis et al., 1992).

Assim como a insulina, o fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) é bem estudado na PIV de embriões em várias espécies: bovino (Matsui et al., 1995; Palma et al., 1997), suíno (Xia et al., 1994), coelho (Herrler et al., 1998), camundongo (O'Neill, 1997) e humano (Lighten et al., 1998) e sua ação é mediada por receptores para IGF, presentes em oócitos imaturos e em embriões pré-implantação (Makarevich & Markkula, 2002).

Augustin et al. (2003) demonstraram que a adição de insulina no meio de CIV de embriões bovinos elevou a taxa de clivagem e de blastocisto, além de aumentar o número de células por blastocisto e reduzir a frequência de apoptose, melhorando a qualidade embrionária PIV, e segundo Khurana & Niemann (2000) a glicose é a fonte predominante de energia após a ativação do genoma embrionário do bovino.

A suplementação do meio de cultivo com IGF-I tem efeito benéfico na PIV de embriões, reduzindo a apoptose e aumentando a proliferação celular em blastocistos de camundongo (Doherty et al., 1994), coelho (Herrler et al., 1998) e humano (Spanos et al., 2000). Makarevich & Markkula (2002) observaram que a adição de fatores de crescimento no meio de CIV preveniu a apoptose na PIV de embriões bovinos, pois o requerimento crítico destes elementos ocorre durante o cultivo embrionário e não na MIV dos oócitos.

Outros fatores podem ser adicionados no meio, associado à insulina, como o selênio, que age como estimuladores da síntese de GSH (Ozolins et al., 1996 apud Lim & Hansel, 2000), além de ser embriotrópico (Ferm et al., 1990 apud Lim & Hansel, 2000). Também, a transferrina, foi identificada como um dos maiores constituintes protéicos nas células da granulosa e no fluido folicular e ampolar, tem ação de quelante de radicais hidroxila, facilita o transporte de ferro e outros metais para dentro do embrião e serve como fator de crescimento (Nasr-Esfahani & Johnson, 1992 apud Lim & Hansel, 2000).

2.4 O ambiente de CIV de embriões

Células cultivadas em ambiente com tensão de oxigênio mais elevada que a fisiológica pode gerar ROS, que induzem a apoptose. Fischer & Bavister (1993) mensuraram a tensão de O₂ intraluminal do oviduto e útero e, observaram uma concentração menor (5 a 8%) que a atmosférica (20%), principalmente durante o período de desenvolvimento embrionário tardio e implantação. No entanto, a condição de O₂ atmosférico é utilizado rotineiramente no cultivo de embriões mamíferos (Lonergan et al., 1999; Van Soom et al., 2002), pois a tensão ótima ainda não foi determinada (Yuan et al., 2003).

Na PIV de embriões bovinos há dois sistemas mais utilizados no CIV: um que utiliza o BSA e o soro fetal bovino (SFB) no meio, com co-cultivo de células do oviduto ou da granulosa, em tensão de 5% de CO₂ em ar, aproximadamente 20% de O₂, e outro que utiliza somente o BSA no meio, sem co-cultivo, em tensão de 5% de CO₂ e 5% de O₂ (Yuan et al., 2003). Ainda, quando se realiza o CIV embrionário sem co-cultivo em tensão de 20% de O₂, as taxas de desenvolvimento são baixíssimas, mas, nestas condições, quando se adiciona um componente de tiol no meio, consegue-se taxas semelhantes às do CIV em tensão de 5% de O₂ (Takahashi et al., 2002).

Foi descrito que o uso de baixa tensão de O₂ (Thompson et al., 1990; Voelkel & Hu, 1992; Liu & Foote, 1995; Lim et al., 1999) ou a adição de antioxidantes no meio de cultivo (Takahashi et al., 1993; Caamaño et al., 1996; Lim et al., 1996) são efetivos no CIV de embriões bovinos. Este efeito promotor do baixo O₂ no ambiente de CIV de embriões também foi reportado para camundongo (Quim & Harlow, 1978), hamster (Bavister, 1988; McKieran & Bavister, 1990), suíno (Voelkel & Hu, 1992; Wright, 1997), coelho (Li & Foote, 1993), ovino (Thompson et al., 1990) e humano (Noda et al., 1994).

A alta tensão de O₂ (20%) promove elevados níveis de ROS (Bicknell & Cohen, 1995 apud Yuan et al., 2003) que alteram a conformação e atividade celular pela ação direta nas quinases e na transcrição e, estão envolvidos na deficiência do desenvolvimento embrionário em condições sub-ideais de cultivo, levando à apoptose no estágio de blastocisto (Yuan et al., 2003). No entanto, não se pode entender porque tensões de hipóxia (5% de O₂), maléficas para a maioria dos tecidos, pode ser benéfica para o embrião em desenvolvimento. Outra consequência de altas concentrações de ROS nas altas tensões de O₂ é o maior consumo de GSH.

A maioria dos trabalhos (Fukui et al., 1991; Nagano et al., 1994; Fujitani et al., 1997 apud Khurana & Niemann, 2000; Lonergan et al., 1999) demonstra efeitos benéficos da baixa

tensão de O₂ (5%) sobre a PIV de embriões bovinos, contrariando os resultados de Khurana & Niemann (2000). Lonergan et al. (1999) observaram que, apesar da tensão de O₂ não ter interferido na taxa de clivagem, houve uma melhor produção de blastocisto em baixa tensão de O₂ no dia oito.

Já, Yuan et al. (2003) observaram que a taxa de embriões de 8 células foi maior na tensão de 20% de O₂ em relação às baixas (2 e 5% de O₂), mas a produção de blastocisto foi maior nas tensões de 2% de O₂ (21%) e de 5% de O₂ (19%) em relação a de 20% de O₂ (11%). Além disso, houve uma maior taxa de apoptose nas tensões de O₂ extremas (2 e 20%) em relação à tensão média (5%). Com isso, concluíram que a melhor tensão de O₂ para embriões bovinos cultivados em meio SOF foi a de 5%, refletindo em maior produção de blastocisto, maior número total de células por embrião e menor taxa de apoptose.

Van Soom et al. (2002) avaliaram a apoptose de embriões pela coloração de TUNEL em duas tensões de oxigênio (5 ou 20% de O₂) na presença de antioxidante (0,6mM de cisteína). A atmosfera de 5% O₂ favoreceu apenas o aumento do número de células da MCI, mas não alterou a taxa de apoptose; no entanto, a adição de cisteína no meio de cultivo prejudicou as taxas de blastocisto, de eclosão e aumentou a de apoptose celular em ambas as tensões de O₂, concluindo que o melhor grupo experimental para a PIV de embriões bovinos foi o meio sem cisteína e sob atmosfera de 5% O₂.

2.5 Apoptose em células embrionárias

Há dois tipos de morte celular, necrose e apoptose, que podem ser diferenciados pela aparência morfológica da célula (Majno & Joris, 1995 apud Gorret et al., 2003). A apoptose é um tipo de morte celular programada, que é regulada por uma sequência de eventos bioquímicos intracelulares e apresenta, como características, alterações morfológicas no núcleo (fragmentação do DNA ordenada em 200 pares de base pela endonuclease) e no citoplasma (picnoses); ainda, o citoplasma se torna denso, com corpos apoptóticos e vesículas, e com aumento do retículo endoplasmático e da permeabilidade da membrana mitocondrial, este último elemento é o fator central durante o processo. Estes efeitos deletérios nas células (dano no DNA, peroxidação lipídica e oxidação de proteínas) são causados pelos peróxidos que desencadeiam a apoptose (Hall, 1999; Van Soom et al., 2002).

No entanto, a apoptose é fisiológica em algumas circunstâncias, chegando a ser essencial na embriogênese e morfogênese, como por exemplo, na remoção da membrana

interdigital de mamíferos superiores pelo estresse oxidativo. Já em outros casos, o estresse oxidativo (modificação oxidativa dos componentes da célula via ROS) é um dos mais potentes processos de dano celular e de suas funções (Van Soom et al., 2002).

Estudos mostraram que a apoptose é um processo normal observado em 70 a 80% de embriões PIV de camundongo (Handyside e Hunter, 1986) e humano (Hardy et al., 1989) e, em todos (100%) os blastocistos de bovino PIV (Byrne et al., 1999). A apoptose ocorre durante o desenvolvimento normal de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, somente começando em estádios diferentes, embriões de 21 células e de 6 células, respectivamente (Neuber, et al., 2002; Gorret et al., 2003).

Van Soom et al. (2002) observaram um aumento na taxa de apoptose e uma redução na mitose com o avançar do desenvolvimento embrionário *in vitro*. Também, Yuan et al. (2003) relataram uma maior taxa de apoptose na MCI de blastocistos em relação ao trofoblasto (TF), provavelmente para eliminar as células da MCI com potencial de TF, células inviáveis ou apenas para um controle populacional (Handyside & Hunter, 1986; Byrne et al., 1999; Van Soom et al., 2002).

O número de células embrionárias e o percentual de morte celular ou apoptose são usuais indicadores da qualidade embrionária. Quanto maior o número de células e menor a taxa de apoptose, melhor é a qualidade do embrião. O embrião pode apresentar apoptose em blastômeros inviáveis, durante a formação da blastocle ou ainda em condições de estresse durante o cultivo *in vitro* (Handyside & Hunter, 1986; Byrne et al., 1999; Van Soom et al., 2002).

Para detectar a apoptose pode-se utilizar a técnica de “*in situ terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay*” (TUNEL), onde a enzima *deoxynucleotidyl transferase* adiciona nucleotídeos biotinilados marcados com fluoresceína no local de quebra da fita de DNA da célula em apoptose, podendo ser visualizada por microscopia de epifluorescência (Yuan et al., 2003).

Até então, não há relatos na literatura, em um mesmo experimento, da adição de antioxidantes no período da MIV de oócitos bovinos e estes utilizados para a PIV em sistemas de CIV com alta e baixa tensão de O₂.

Portanto, este trabalho comparou a adição de componentes de thiol no meio de MIV de oócitos bovinos, para estimular a síntese de GSH, com posterior CIV em dois sistemas, com 5% ou 20% de O₂, verificando-se a produção e a qualidade embrionária.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fertilização *In Vitro* do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

3.1 Experimento I: Influência da adição de aditivos no meio de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos

Neste experimento se avaliou a influência da adição de componentes de thiol, associado ou não à mistura ITS (insulina, transferrina e selênio), na maturação nuclear, na migração dos grânulos corticais (GCs) para a periferia da membrana citoplasmática e na concentração intracelular de glutathione (GSH) de oócitos bovinos maturados *in vitro* (MIV), divididos em seis grupos experimentais.

3.1.1 Obtenção e seleção dos oócitos bovinos

Os oócitos foram obtidos de ovários bovinos coletados em abatedouro e transportados ao laboratório em solução salina a temperatura de 30 a 33°C. Os folículos antrais de 3 a 8mm de diâmetro foram aspirados com seringa (20mL) agulhada (30x10mm) e o fluido folicular contendo os oócitos foi transferido para tubos cônicos (50mL) e decantado por 15min em estufa úmida a 38,5°C e 5% de CO₂ em ar. Posteriormente, este sedimento foi transferido para placas de Petri (90mm), pré-aquecidas a 37°C, onde os oócitos foram procurados sob microscopia estereoscópica (aumento de 25x). Os oócitos recuperados foram transferidos para uma placa de Petri (35mm), contendo meio *tissue culture medium-199* (TCM-199) Hepes suplementado (meio de lavagem) (ANEXO A).

3.1.2 MIV dos oócitos bovinos

Os oócitos aspirados foram selecionados segundo descrito por Loos et al. 1991, onde:

- a) **grau I:** revestimento com multi-camadas de cumulus compacto, ooplasma homogêneo e complexo oóctio-cumulus claro e transparente;
- b) **grau II:** revestimento com 3 a 5 camadas de cumulus compacto, ooplasma homogêneo e pode ocorrer regiões escuras na periferia do oócito;
- c) **grau III:** pouco revestimento de células do cumulus (1 a 3 camadas) e ooplasma irregular com picnose;
- d) **grau IV ou atrésico:** cumulus expandido com células escuras e em grumos e complexo oóctio-cumulus escuro e irregular;
- e) **desnudo:** não apresenta camadas do cumulus e ooplasma uniforme ou com granulações.

Os oócitos selecionados, de grau I, II e III, foram divididos igualmente em seis grupos, lavados uma vez em meio de lavagem e uma vez em meio de maturação, correspondente ao grupo experimental, e distribuídos em número de 25 oócitos por microgota (100µL), sob óleo mineral, com meio de maturação específico para cada tratamento, como descrito a seguir. Esta distribuição foi aleatória entre os seis grupos experimentais, seguida de cultivo em estufa úmida a 38,5°C e 5% de CO₂ em ar, durante 24h.

No intuito de se evitar a interferência do soro fetal bovino (SFB) na ação dos componentes de thiol testados, os meios de maturação adicionados destes componentes foram suplementados apenas com albumina sérica bovina (BSA) (0,5%), proporcionando-lhe condições semi-definidas.

Os meios de maturação (tratamentos) utilizados foram os seguintes:

- a) **Controle do Laboratório (S):** meio TCM-199 Bicarbonato base (ANEXO B), suplementado com SFB¹ (10%);
- b) **Controle BSA (B):** meio TCM-199 Bicarbonato base (ANEXO B), suplementado com BSA² (0,5%);
- c) **BSA + Cisteína (BC):** meio B, adicionado de L-cisteína³ (825µM);
- d) **BSA + Cisteína + Cisteamina (BCC):** meio BC, adicionado de cisteamina⁴ (100µM);

¹ Cultilab Materiais de Cultivo Celular Ltda[®] - Campinas-SP

² SIGMA – cat n^o A-8806 ou 6003 – St. Louis, MO - USA

³ SIGMA – cat n^o C-8152

⁴ SIGMA – cat n^o M-9768

e) BSA + Cisteína + Cisteamina + ITS (BCCI): meio **BCC**, adicionado de uma mistura de ITS⁵ (8mg de insulina, 8mg de transferrina e 8µg de selênio por mL de meio);

f) BSA + Cisteína + ITS (BCI): meio **BC**, adicionado de ITS⁵.

Após 24h da MIV, metade dos oócitos foram destinados à verificação da maturação nuclear e a migração dos GCs para a periferia da membrana citoplasmática e, a outra metade, à mensuração da concentração intracelular de GSH.

3.1.3 Avaliação da maturação oocitária

A maturação oocitária foi avaliada pelo estágio da meiose (maturação nuclear) e pela migração dos GCs para a periferia da membrana citoplasmática (maturação citoplasmática), utilizando-se 1084 oócitos, divididos entre os tratamentos, pela metodologia modificada da descrita por Cherr et al. (1988).

Após a maturação por 24h, a zona pelúcida dos oócitos foi removida em pronase⁶ (0,5% em PBS) por 5min ou em solução ácida (pH 2,5) por 5seg e, em seguida, lavados com TL-HEPES-PVA e fixados por 30min em paraformaldeído (3% em PBS) a temperatura ambiente. Após a fixação, foram lavados por cinco vezes, 3min cada vez, em solução de bloqueio (SB) (PBS com 1mg/mL de BSA, 100mM de glicina e 0,2% de azida sódica) e permeabilizados em Triton X-100⁷ (0,1% em SB) por 5min a 38°C.

Após a permeabilização, os oócitos foram incubados, por 15min, em aglutinina de *Lens culinaris*⁸ (10µg/mL de SB) conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC-LCA); esta lecitina se liga especificamente à α -D-manose presente nos GCs. Em seguida, os oócitos foram lavados três vezes em SB, corados com Hoechst 33342⁹ (10µg/mL de SB) por 10min, lavados novamente em SB, colocados entre lâmina e lamínula e avaliados sob microscopia epifluorescente (Olympus – IX-FLA-70, Tokyo, Japão). Em cada grupo experimental, os oócitos foram avaliados quanto à maturação nuclear (excitação 330-385nm e emissão 420nm, para o Hoechst) e à migração dos GCs para a periferia da membrana citoplasmática (filtro FITC: excitação 460-490nm e emissão 515nm, para o isotiocianato de fluoresceína).

⁵ SIGMA – cat n° I-1884

⁶ SIGMA – cat n° P-8811

⁷ SIGMA – cat n° T-9284

⁸ SIGMA – cat n° L-9262

⁹ SIGMA – cat n° B-2261

Os oócitos foram considerados não maduros ou com maturação parcial quando apresentaram núcleo no estágio de quebra da vesícula germinativa (VGBD) ou de anáfase I (AI) / telófase I (TI) e/ou migração inadequada dos GCs (“clusters” ou migração parcial). Já, os que apresentaram núcleo no estágio de metáfase II (MII) e migração dos GCs para a periferia da membrana citoplasmática foram considerados com maturação nuclear e citoplasmática, respectivamente.

3.1.4 Mensuração da concentração intracelular de GSH dos oócitos MIV

A concentração de glutathiona intracelular dos oócitos maturados, nos seis diferentes meios de maturação (n=1020), foi mensurada seguindo o protocolo adaptado do descrito por Browne & Armstrong (1998).

Após 24h de MIV, os oócitos de cada tratamento foram desnudados com hialuronidase¹⁰ (0,2%) e depositados em microtubo (500µL), em grupos de 30 oócitos, contendo 100µL de solução de extração de ácido meta-fosfórico¹¹ (SEAM) (1,67g de ácido metafosfórico, 200mg de EDTA e 30g de NaCl em 90ml de água Mill-Q), seguindo agitação com agulha de insulina (29G ½”) para a lise dos mesmos. As amostras foram estocadas em freezer -20°C para posterior processamento.

Após a colheita de cinco repetições, as amostras foram descongeladas e centrifugadas por 4min a 1.500rpm, para a precipitação dos “debris” celulares. O sobrenadante (100µL) de cada amostra foi transferido individualmente para um tubo de ensaio de vidro, contendo 2mL de solução tampão de glutathiona (TG) (0,1M de fosfato de sódio monobásico e 5mM de EDTA em 1L de água Milli-Q; acertar o pH para 8,0), ao qual foi adicionado 100µL do reagente *o-phthaldialdehyde*¹² (OPT) (25mg de OPT em 25mL de metanol), seguido de incubação por 15min no escuro. As amostras foram lidas em espectrofluorímetro (Shimadzu – RF-1501, Kyoto, Japão) ajustado para emissão de fluorescência de 420nm e excitação de 350nm. A concentração em pmol de GSH total de cada amostra foi determinada pela equação da reta obtida da curva padrão da concentração de GSH, construída a partir de concentrações conhecidas de GSH (item 3.1.4.1). Esta concentração foi dividida pelo número de oócitos do microtubo avaliado (30), obtendo-se a concentração intracelular de GSH em pmol por oócito.

¹⁰ SIGMA – cat n° H-4272

¹¹ SIGMA – cat n° M-5043

¹² SIGMA – cat n° O-0657

3.1.4.1 Construção da Curva Padrão da Concentração de GSH

Foi preparada uma solução padrão de GSH (0,1mg de GSH reduzida¹³/mL de TG). Esta solução padrão foi diluída em água Milli-Q, perfazendo cinco concentrações decrescentes (0,05, 0,04, 0,03, 0,02 e 0,01mg de GSH/mL) e uma sem GSH (branco, 0mg/mL). De cada diluição, 100µL foram transferidos para um tubo de ensaio de vidro, contendo 1,9mL de SEAM (1ª diluição). Após homogeneização, 100µL foram transferidos para outro tubo de ensaio de vidro, contendo 2mL de TG. Após homogeneização, foram adicionados 100µL do reagente OPT em cada tubo (2ª diluição), homogeneizados e incubados por exatamente 15min no escuro. As amostras foram lidas em espectrofluorímetro (Shimadzu – RF-1501, Kyoto, Japão) ajustado para emissão de fluorescência de 420nm e excitação de 350nm.

Foram realizadas cinco repetições para cada diluição e, suas leituras convertidas em pmol de GSH, seguindo as transformações:

[] inicial (mg/mL)	[] inicial (pg/mL)	[] 1ª diluição (pg/mL)	[] 2ª diluição (pg/mL)	[] 2ª diluição (pg/L)	[] final (pmol)*
0,01	10.000	500	22,727	22.727	73,957
0,02	20.000	1.000	45,455	45.455	147,917
0,03	30.000	1.500	68,182	68.182	221,874
0,04	40.000	2.000	90,909	90.909	295,831
0,05	50.000	2.500	113,636	113.636	369,788

* 1 mol de GSH = 307,3g/L e 1pmol de GSH = 307pg/L

Com esta tabela foram obtidas a curva padrão e a equação da reta ($y = 1,5274x + 36,963$) (Figura 3), utilizada na determinação das concentrações intracelulares de GSH dos oócitos.

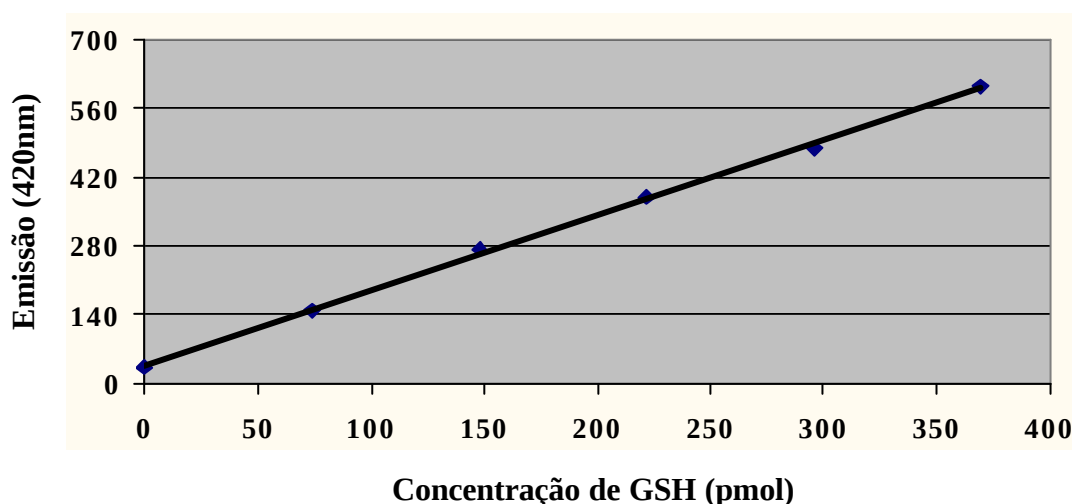


Figura 3: Curva Padrão de GSH, construída com concentrações conhecidas, utilizada para a conversão de valores lidos no espectrofluorímetro em nm para pmol de GSH.

¹³ SIGMA – cat n° G-6013

3.2 Experimento II: Avaliação do desenvolvimento e da qualidade de embriões produzidos *in vitro* (PIV), em dois sistemas de cultivo, com oócitos bovinos MIV na presença de componentes de thiol

Neste experimento se avaliou o desenvolvimento e a qualidade de embriões PIV a partir de oócitos MIV em um dos dois melhores meios do Experimento I (BC e BCC) em comparação ao controle do laboratório (S). Também, foi verificada a influência de dois sistemas de cultivo (baixa ou alta tensão de O₂) nestes parâmetros.

3.2.1 Obtenção e maturação dos oócitos bovinos

Os oócitos (n=3403) foram obtidos como descrito anteriormente (item 3.1.1) e divididos em três grupos para a maturação. A MIV foi semelhante à descrita no item 3.1.2, com exceção dos meios utilizados que foram: meio controle do laboratório (S) ou um dos dois meios que apresentaram melhores resultados no Experimento I (BC e BCC).

3.2.2 Fecundação *in vitro* (FIV) dos oócitos bovinos

Após 20h da MIV, a placa de fecundação foi preparada com microgotas (90µL), sob óleo mineral, com meio de fecundação (TALP-FIV) (ANEXO G), segundo Bavister (1989).

A palheta de sêmen foi descongelada em água, de forma padrão (35°C/30seg), e lavado por duas vezes em 2mL de meio TL-Sêmen (ANEXO F) cada vez, adicionado de antibiótico (ANEXO K) e 2µL/ml do estoque C (ANEXO J), por centrifugação a 500rpm (43xg), durante 5min. Na última lavagem, 60µL do sedimento foi recuperado e depositado em um microtubo (500µL), contendo 30µL de meio TALP-FIV, seguindo avaliação de suas características (motilidade e concentração espermáticas). A concentração final foi ajustada para 25×10^6 espermatozóides vivos por mL.

Foram adicionados 8µL desta mistura em cada microgota da placa de FIV, resultando em uma concentração de 200×10^3 de espermatozóides por microgota de FIV, correspondendo a 8×10^3 de espermatozóides por oócito.

Os oócitos de cada grupo, com 24h de maturação, foram lavados em gotas de 100µL de meio TALP-FIV e transferidos para a placa de FIV, onde foram distribuídos 25 oócitos para cada microgota de fecundação, contendo os espermatozóides, homogeneizando-os.

Em seguida as placas de FIV foram incubadas em estufa úmida a 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar, por 20h, para a fecundação.

Todo o processo, incluindo o sêmen e o meio, de FIV foi realizado nas mesmas condições para todos os três grupos de MIV.

3.2.3 Cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões bovinos

Para o CIV foram avaliados dois sistemas de cultivo: baixa tensão de O₂ (5% de CO₂ e 5% de O₂), denominado sistema com 5% de O₂, alta tensão de O₂ (5% de CO₂ em ar, aproximadamente 20% de O₂), denominado sistema com 20% de O₂.

Decorrido o período de fecundação (20h), os prováveis zigotos de cada grupo foram subdivididos em dois sub-grupos, onde metade foi transferida para um microtubo (1,5mL) contendo 100µL de meio TALP-FIV, passando por agitação (*vortex*), durante 1min, para a remoção parcial das células do *cumulus oophorus* remanescentes. Posteriormente, a outra metade passou pelo mesmo processo, mas durante 3min para promover seu desnudamento total. Após o desnudamento parcial ou total, os zigotos foram lavados três vezes em meio TALP-FIV para a eliminação das células desagregadas.

Os zigotos com desnudamento total foram lavados uma vez em meio de cultivo (SOFaa) suplementado apenas com 0,5% de BSA, transferidos para a sua placa de CIV e cultivados em estufa úmida a 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ e 5% de O₂ (sistema com 5% de O₂). Os com desnudamento parcial foram lavados uma vez em meio de cultivo (SOFaa) suplementado com 2,5% de SFB e 0,5% de BSA, transferidos para a sua placa de CIV e cultivados em estufa úmida a 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar (sistema com 20% de O₂).

As placas de cultivo para cada sub-grupos foram preparadas no dia anterior, com microgotas de 50µL de meio SOFaa suplementado e colocadas diferentemente nas atmosferas correspondentes.

O CIV destes embriões nestas condições foi realizado durante sete dias, onde, após 48h de cultivo, foram adicionados 50µL de meio SOFaa, suplementado diferentemente a cada sub-grupo, às gotas. Após 96 horas metade do meio foi renovado.

3.2.4 Quantificação das taxas de clivagem e de desenvolvimento dos embriões CIV

A competência dos embriões CIV foi avaliada pela verificação da porcentagem de clivagem (48h após a FIV) e de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (7º dia após a FIV). Estes embriões foram PIV a partir de oócitos MIV em três meios diferentes (S, BC ou BCC) e CIV em dois sistemas de cultivo (sistema com 5% ou 20% de O₂).

Os 936 blastocistos produzidos neste experimento foram divididos igualmente em dois grupos para a avaliação da qualidade proporcional entre a massa celular interna (MCI) e o trofoblasto (TF) do número de células em apoptose (fragmentação do DNA) destes embriões, como segue.

3.2.5 Verificação da qualidade proporcional do número de células da MCI e do TF nos embriões CIV

A qualidade morfológica dos blastocistos produzidos foi avaliada pela proporção do número de células da MCI e do TF em relação ao número total (T) de células. Metade (n=475) dos blastocistos produzidos em cada tratamento/repetição foi corada pela técnica da coloração diferencial.

3.2.5.1 Determinação diferencial do número de células da MCI e do TF

O número de células da MCI e do TF foi determinado pela coloração diferencial por fluorocromo, descrita por Iwasaki et al. (1990).

A zona pelúcida dos blastocistos foi removida em pronase (0,5% em PBS) por 5min ou em solução ácida (pH 2,5) por 5seg e, em seguida, lavados três vezes em gotas de 100µL de meio TCM-199 Hepes com 10% de SFB e duas vezes em meio TCM-199 Hepes sem SFB.

Posteriormente, estes blastocistos foram fixados em solução de PBS com ácido pícrico¹⁴ (10mM) e polivinil-pirrolidona¹⁵ (PVP) (3mg/mL) sobre gelo, durante 10min.

¹⁴ Reagen – Quimibrás Indústrias Químicas, SA – Rio de Janeiro-RJ

¹⁵ SIGMA – cat n° PVP-40

Após a lavagem em 100µL de meio TCM-199 Hepes com 10% de SFB, estes embriões foram incubados, a 38,5°C por 30min, em meio TCM-199 Hepes sem SFB e com soro de coelho anti-bovino, na proporção de 1:10.

Após nova lavagem em 100µL de meio TCM-199 Hepes com 10% de SFB, estes embriões foram então incubados, a 38,5°C por 30min, em meio TCM-199 Hepes sem SFB e com complemento de cobaia, na proporção de 1:10, acrescido de iodeto de propídio¹⁶ (10µg/mL) (corante não vital) e de Hoechst 33342 (10µg/mL) (corante vital).

Por fim, estes embriões foram lavados em PBS com 0,3% de BSA e colocados entre lâmina e lamínula com glicerina tamponada (9:1), onde foram levemente achatados por pressão manual sobre a lamínula.

Estes blastocistos foram avaliados em microscópio de epifluorescência (excitação de 330-385nm e emissão de 420nm) quanto ao número de células da MCI (núcleos com fluorescência azul, determinada pelo Hoechst 33342) e do TF (núcleos com fluorescência rosa, determinada pelo iodeto de propídio).

3.2.6 Avaliação do número de células em apoptose dos embriões CIV

A taxa de apoptose das células dos blastocistos produzidos foi avaliada pela proporção do número de células com fragmentação de DNA da MCI e do TF em relação ao número total (T) de células do blastocisto. A outra metade (n=461) dos blastocistos produzidos em cada tratamento/repetição foi corada pela técnica da coloração TUNEL.

3.2.6.1 Determinação do número de células com DNA fragmentado na MCI e no TF

As células em apoptose dos embriões foram marcadas pela coloração “*In situ terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay*” (TUNEL), descrita por Paula-Lopes & Hansen (2002).

Os blastocistos foram lavados por quatro vezes em 100µL de PBS com PVP (1mg/mL) (PBS-PVP) e, posteriormente fixados, com a zona pelúcida intacta, em 100µL de solução de paraformaldeído (4% em PBS, pH 7,4) a temperatura ambiente, por 1h. Após este período, os

¹⁶ SIGMA – cat n° P-4170

embriões foram lavados em 100µL de PBS-PVP e foram armazenados sob refrigeração (4°C), por 1 a 7 dias, para posterior processamento.

Estes embriões foram então permeabilizados em 200µL de solução de Triton X-100 (0,5%, v/v) em citrato de sódio (0,1%), por 30min em temperatura ambiente.

Após a permeabilização, os embriões reservados para controle positivo foram incubados com DNase I¹⁷ (50UI/mL de água Milli-Q) (RNase *free*) a 37°C por 1h, enquanto que os embriões dos tratamentos ficaram em gotas de 100µL de PBS-PVP.

Posteriormente, todos os embriões foram lavados em 100µL de PBS-PVP e incubados, em câmara úmida, com 15µL da mistura (1:9, da enzima – tubo 1 e do tampão da enzima – tubo 2, respectivamente) para a coloração TUNEL (*In Situ Cell Death Detection Kit*¹⁸, *Fluorescein*, Roche Diagnostics, Germany), por 1h a 37°C no escuro. Os embriões reservados para controle negativo foram incubados na ausência da enzima *terminal deoxynucleotidyl transferase* (TdT) (tubo 1, contida no kit).

Após este período, os embriões foram incubados em 100µL de RNase A¹⁹ (50µg/mL de água Milli-Q) por 1h em temperatura ambiente, seguida por incubação com iodeto de propídio (0,5µg/mL de PBS-PVP) por 30min em temperatura ambiente.

Por fim, estes embriões foram lavados em PBS-PVP e colocados entre lâmina e lamínula com glicerina tamponada (9:1), onde foram levemente achatados por pressão manual sobre a lamínula.

Estes blastocistos foram avaliados em microscópio de epifluorescência (excitação de 510-550nm e emissão de 590nm) quanto ao número de células com fragmentação de DNA (TUNEL positivas – fluorescência verde ou amarela pontual dentro do núcleo) localizadas na MCI e no TF em relação ao número total de células do blastocisto, determinado pelos núcleos corados em vermelho pelo iodeto de propídio.

¹⁷ Amersham Pharmacia Biotech Inc. – Piscataway, NJ-USA

¹⁸ Roche Diagnosis GmbH – Indianapolis, IN-USA – cat n° 1 684 795

¹⁹ USB Corporation – Cleveland, Ohio-USA

3.3 Delineamento experimental

O presente trabalho foi constituído de dois experimentos.

No primeiro experimento avaliou-se a influência de seis diferentes meios de maturação (item 3.1.2) na porcentagem de maturação nuclear, na migração dos GCs para a periferia da membrana citoplasmática e na concentração intracelular de GSH em oócitos bovinos MIV.

Experimento I – Avaliação da maturação nuclear, da migração dos Gcs e da concentração intracelular de GSH em oócitos bovinos:

S	B	BC	BCC	BCCI	BCI
---	---	----	-----	------	-----

No segundo experimento avaliou-se a influência do meio controle do laboratório (S) e dos dois meios que apresentaram melhores resultados no Experimento I (BC e BCC) em relação ao desenvolvimento embrionário (quantidade e qualidade embrionária) em dois sistemas de cultivo (sistema com 5% ou 20% de O₂), obtendo-se um fatorial 3x2, com um total de 6 tratamentos:

* 3 ⇒ meios de maturação (S, BC e BCC);

* 2 ⇒ tensões de O₂ (aproximadamente 20% no ar e 5%).

Experimento II - Avaliação da clivagem, da produção embrionária de blastocisto, da qualidade proporcional entre MCI e TF e do número de células em apoptose em oócitos bovinos:

S	x 5% de CO ₂ e 5% de O ₂ (sistema com 20% de O ₂)	S	x 5% de CO ₂ em ar (sistema com 20% de O ₂)
BC		BC	
BCC		BCC	

Para cada tratamento foram utilizados aproximadamente 100 oócitos, em cada uma das quatro ou cinco repetições, no Experimento I e no II, respectivamente.

Os parâmetros avaliados foram:

- Experimento I: maturação nuclear e migração dos GCs para a periferia do oócito (n=1084 oócitos) e, concentração intracelular de GSH (n=1020 oócitos);
- Experimento II: clivagem e produção embrionária de blastocisto (n=3403 oócitos e 936 blastocistos), qualidade proporcional entre MCI e TF (n=475 blastocistos) e número de células em apoptose (n=461 blastocistos).

3.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa “*Statistical Analysis System*” (SAS Institute Inc, 1989), SAS\STAT Software, Release 8.2. Cary: SAS Institute Inc. (Littlell et al., 1996).

Experimento I: os grupos de oócitos maturados foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA) para um modelo linear generalizado para as variáveis porcentagem de maturação nuclear e migração dos GCs para a periferia e, concentração de GSH intracelular. Utilizou-se o teste de Duncan, para as duas primeiras variáveis, e o de Tukey, para a última variável, para a comparação entre os tratamentos. Além disso, foi verificada a correlação entre a concentração de GSH e a migração dos GCs para a periferia.

Experimento II: foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) para um delineamento fatorial 3x2 em blocos casualizados para as variáveis: clivagem e produção de blastocisto, porcentagem de MCI e de TF em relação ao número total de células do embrião e, porcentagem de células em apoptose localizadas na MCI ou no TF. A unidade experimental para cada tratamento foi a gota de cultivo contendo 25 oócitos cada e os blocos foram as repetições da PIV. Para a comparação entre os tratamentos, utilizou-se o teste de Duncan para a primeira variável e, o de Fisher para as duas últimas, para a comparação entre as médias e as frequências.

Foi considerada uma significância de 5% para todos os testes.

Quando houve interação entre grupo de MIV e o sistema de cultivo, a variável avaliada só pode ser analisada dentro de cada nível, ou seja, somente dentro do grupo de MIV ou do sistema de cultivo. Esta interação ocorreu em algumas variáveis do Experimento II.

Resultados

4 RESULTADOS

Neste experimento oócitos bovinos maturados *in vitro* (MIV) foram avaliados quanto à maturação nuclear, à migração dos grânulos corticais (GCs) para a periferia da membrana citoplasmática e à concentração intracelular de glutathiona (GSH), em seis meios diferentes (Experimento I: S, B, BC, BCC, BCCI ou BCI). Posteriormente, avaliou-se a produção embrionária, quantitativa (clivagem e produção de blastocisto) e qualitativamente (quantidade celular diferenciada e frequência de apoptose nos blastocistos), após a MIV nos dois melhores meios do Experimento I (BC e BCC) ou no controle do laboratório (S) e CIV em dois sistemas diferentes (Experimento II: 5% ou 20% de O₂).

4.1 Experimento I: Influência da adição de aditivos no meio de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos

4.1.1 Avaliação da maturação oocitária

Foram avaliados 1084 oócitos, distribuídos nos seis grupos experimentais em quatro repetições, dos quais 1075 (99,17%) estavam em metáfase II e 1012 (93,34%) apresentavam seus GCs dispostos na periferia da membrana citoplasmática (Figura 4).

As taxas de maturação nuclear e de oócitos com GCs dispostos na periferia da membrana citoplasmática entre os grupos não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$). No entanto, a média do grupo BCCI (80,62%) com GCs na periferia foi numericamente menor que os outros grupos (S=95,17%; B=94,81%; BC=93,75%; BCC=96,62% e BCI=97,37%), além de apresentar uma grande variação (SD=12,86) (Tabela 1 e Figura 5).

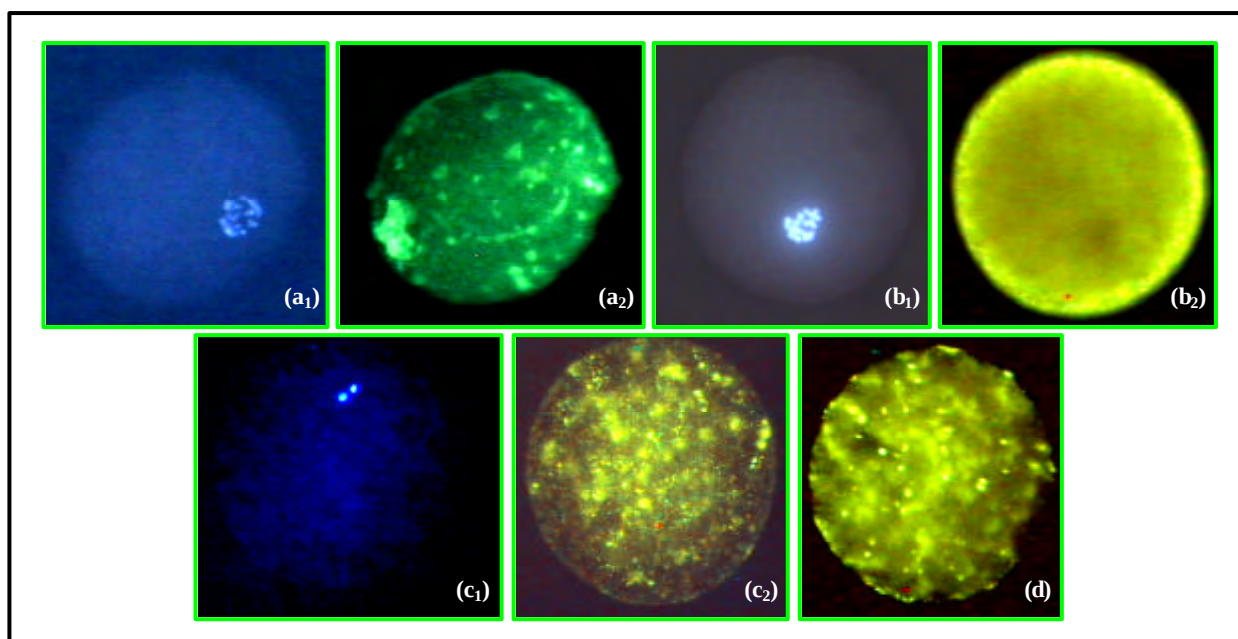


Figura 4: Oócitos de bovino MIV por 24h. **(a)** oócito não maduro: **(a₁)** vesícula germinativa e **(a₂)** GCs dispostos em “clusters”; **(b)** oócito com maturação completa: **(b₁)** metáfase II e **(b₂)** GCs em toda a periferia da membrana plasmática; **(c)** maturação incompleta: **(c₁)** anáfase I / telófase I; **(c₂)** GCs dispostos em “clusters”; **(d)** migração parcial: GCs distribuídos tanto no centro como na periferia (maturação incompleta). Azul: Hoechst 33342; Verde: Isotiocianato de fluoresceína (*Lens cullinaris*). Imagens digitalizadas.

Tabela 1: Número e porcentagem média de oócitos MIV (maturação nuclear e GCs na periferia), por 24h, em seis meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH

Grupo	Nº de oócitos	Nuclear M II (%)	GCs na periferia (%±SD)
S	207	204 (98,55)	197 (95,17±7,58)
B	154	153 (99,35)	146 (94,81±8,93)
BC	195	192 (98,46)	180 (93,75±4,25)
BCC	207	207 (100)	200 (96,62±4,23)
BCCI	129	129 (100)	104 (80,62±12,86)
BCI	192	190 (98,96)	185 (97,37±3,83)
Total	1084	1075 (99,17)	1012 (93,34)

Valores seguidos de letras diferentes, dentro de cada coluna, diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

M II = oócito em metáfase II (maturos)

S = TCM-199b + 10% de SFB

B = TCM-199b + 0,5% de BSA

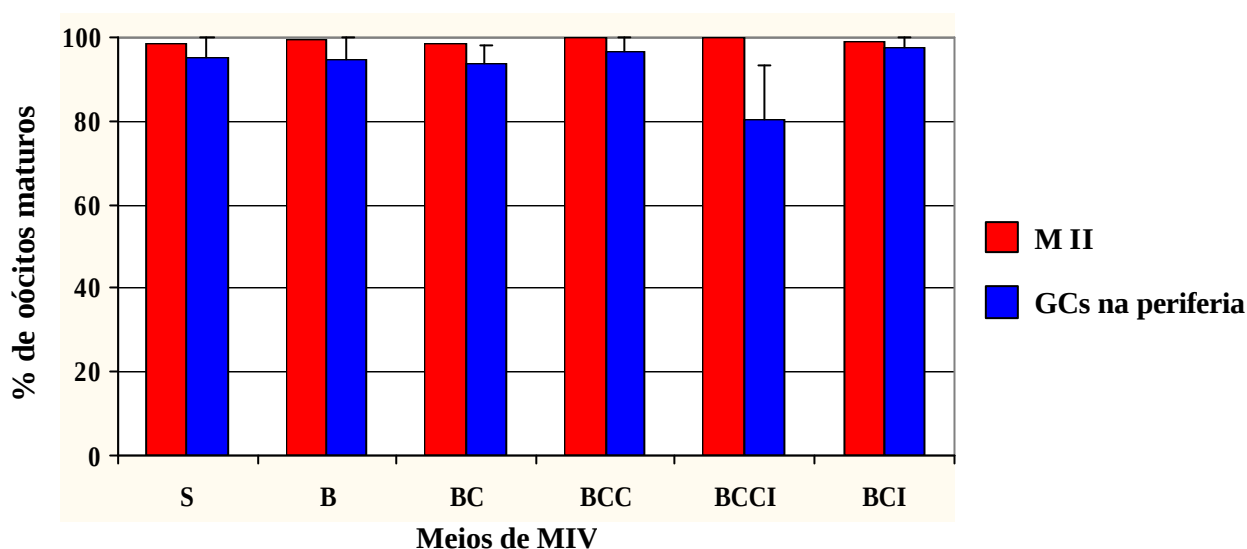
BC = meio B + cisteína (0,825mM)

GCs na periferia = grânulos corticais na periferia (maturos)

BCC = meio BC + cisteamina (100µM)

BCCI = meio BCC + ITS (8:8:8)

BCI = meio BC + ITS (8:8:8)



Letras diferentes, dentro de cada variável, diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

M II = oócito em metáfase II (maturos)

GCs na periferia = grânulos corticais na periferia (maturos)

S = TCM-199b + 10% de SFB

BCC = meio BC + cisteamina (100 μ M)

B = TCM-199b + 0,5% de BSA

BCCI = meio BCC + ITS (8:8:8)

BC = meio B + cisteína (0,825mM)

BCI = meio BC + ITS (8:8:8)

Figura 5: Porcentagem média de oócitos MIV (maturação nuclear e GCs na periferia), por 24h, em seis meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH.

4.1.2 Mensuração da concentração intracelular de GSH dos oócitos MIV

Foram avaliados 1020 oócitos, distribuídos nos seis grupos experimentais em três repetições, com descarte de uma repetição.

As concentrações intracelulares de GSH entre os grupos estão apresentadas na Tabela 2 e na Figura 6.

Os grupos BC (4,25pmol), BCC (4,97pmol) e BCCI (4,42pmol) apresentaram maiores concentrações intracelulares de GSH ($p < 0,001$) em relação aos grupos S (1,83pmol), B (2,63pmol) e BCI (2,23pmol) (Tabela 2 e Figura 6).

Tabela 2: Concentração intracelular média de GSH por oócito (pmol/oócito $\pm$ SD) de oócitos MIV, por 24h, em seis meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH

Grupo	Nº de oócitos	[] média de GSH (pmol/oócito $\pm$ SD)
S	207	1,83 $\pm$ 0,19 ^b
B	154	2,63 $\pm$ 0,44 ^b
BC	195	4,25 $\pm$ 0,40 ^a
BCC	207	4,97 $\pm$ 0,71 ^a
BCCI	129	4,42 $\pm$ 0,79 ^a
BCI	192	2,23 $\pm$ 0,69 ^b
Total	1020	Média total = 3,39pmol/oócito

Valores seguidos de letras diferentes, dentro de cada coluna, diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

[] média de GSH = concentração intracelular média de GSH

S = TCM-199b + 10% de SFB

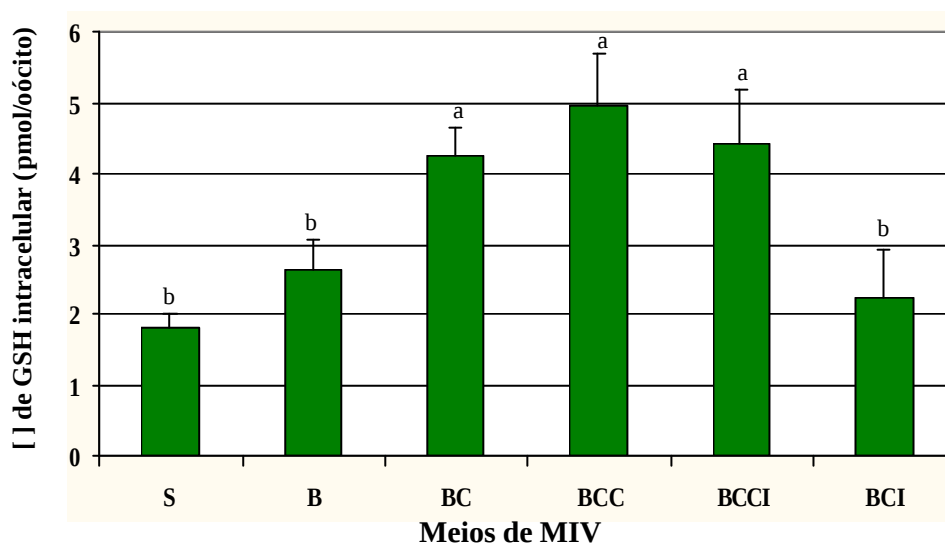
BC = meio B + cisteína (0,825mM)

BCCI = meio BCC + ITS (8:8:8)

B = TCM-199b + 0,5% de BSA

BCC = meio BC + cisteamina (100 μ M)

BCI = meio BC + ITS (8:8:8)



Letras diferentes diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

S = TCM-199b + 10% de SFB

BC = meio B + cisteína (0,825mM)

BCCI = meio BCC + ITS (8:8:8)

B = TCM-199b + 0,5% de BSA

BCC = meio BC + cisteamina (100 μ M)

BCI = meio BC + ITS (8:8:8)

Figura 6: Concentração intracelular média de GSH por oócito (pmol/oócito $\pm$ SD) de oócitos MIV, por 24h, em seis meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH.

Quando se comparou as taxas de maturação oocitária e as concentrações de GSH intracelular dos oócitos MIV não foi observada correlação significativa ($p > 0,4$) entre os tratamentos.

4.2 Experimento II: Avaliação do desenvolvimento e da qualidade de embriões produzidos *in vitro* (PIV), em dois sistemas de cultivo, com oócitos bovinos MIV na presença de componentes de thiol

Os dois melhores meios do Experimento I foram escolhidos baseado em seus resultados, onde se observou uma similaridade na maturação nuclear e na migração dos GCs para a periferia da membrana citoplasmática entre os grupos e uma maior concentração intracelular de GSH ($p < 0,05$) dos meios BC, BCC e BCCI (Tabelas 1 e 2 e Figuras 5 e 6).

Já que os meios BC, BCC e BCCI apresentaram similaridade estatística, a escolha dos dois melhores meios foi realizada observando-se a diferença numérica, bem como a sua complexidade de manipulação e o seu custo. Portanto, optou-se pelos meios BC e BCC para serem utilizados no Experimento II, em comparação ao controle do laboratório (S).

4.2.1 Quantificação das taxas de clivagem e de desenvolvimento dos embriões CIV

Foram MIV 3403 oócitos, em um dos três meios (S, BC ou BCC), fertilizados *in vitro* (FIV) e, depois, cultivados *in vitro* (CIV) em dois sistemas de cultivo (com 5% ou 20% de O_2). Foram realizadas cinco repetições.

As taxas médias de clivagem (48h após a FIV) e de produção de blastocisto (sétimo dia de CIV) de cada grupo estão apresentadas na Tabela 3 e na Figura 7. Tanto a clivagem quanto a produção de blastocisto não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre os grupos e entre os sistemas de cultivo (Tabela 3 e Figura 7).

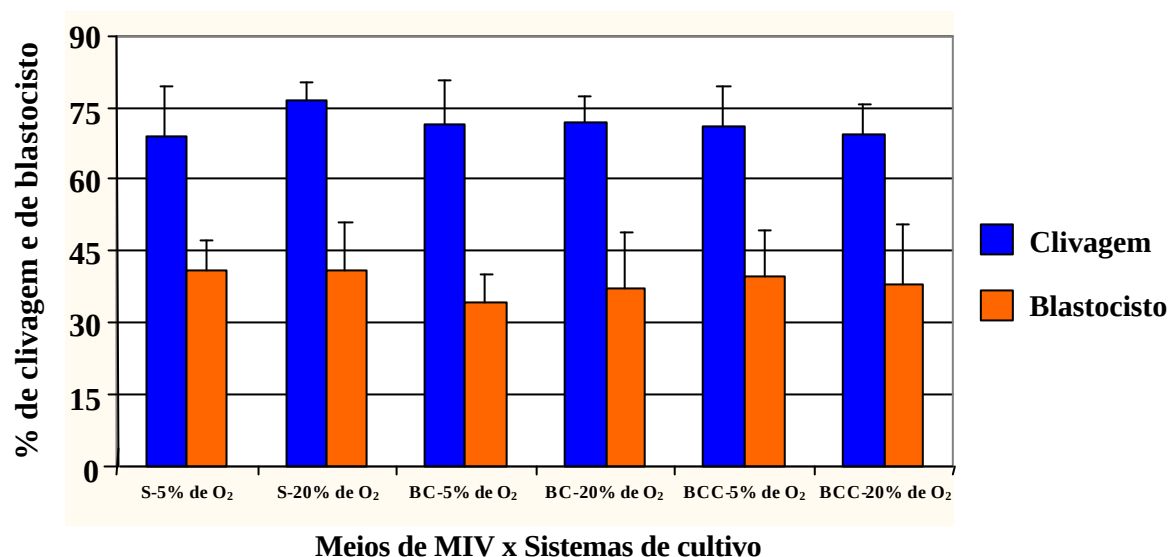
Dos 3403 oócitos MIV, FIV e CIV, foram produzidos 936 blastocistos (27,5%), dos quais 252 foram verificados quanto a sua qualidade proporcional entre MCI e TF e, 434, avaliados quanto ao número de células em apoptose.

Tabela 3: Número de oócitos e porcentagem média de clivagem e de produção de blastocisto (sete dias após a FIV) de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH, e CIV dos embriões em dois sistemas de cultivo

Grupo de MIV	Sistema de cultivo	Nº de oócitos	Clivagem (% média±SD)	Blastocisto (% média±SD)
S	5% de O ₂	603	417 (69,15±12,28)	172 (41,12±6,10)
	20% de O ₂	546	417 (76,37±4,79)	171 (41,01±9,78)
BC	5% de O ₂	589	421 (71,48±9,23)	144 (34,20±5,89)
	20% de O ₂	543	389 (71,64±5,42)	145 (37,28±11,63)
BCC	5% de O ₂	540	383 (70,93±8,65)	151 (39,43±9,94)
	20% de O ₂	582	404 (69,42±6,22)	153 (37,87±12,50)
Subtotal	5% de O ₂	1732	1221 (70,50%)	467 (38,25%)
	20% de O ₂	1671	1210 (72,41%)	469 (38,76%)
Total	-	3403	2431 (71,44%)	936 (38,50%)

Valores seguidos de letras diferentes, dentro de cada coluna, diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

S = TCM-199b + 10% de SFB BC = meio B + cisteína (0,825mM) BCC = meio BC + cisteamina (100µM)
 5% de O₂ = CIV no sistema com 5% de O₂ 20% de O₂ = CIV no sistema com 20% de O₂



Letras diferentes, dentro de cada variável, diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

S = TCM-199b + 10% de SFB BC = meio B + cisteína (0,825mM) BCC = meio BC + cisteamina (100µM)
 5% de O₂ = CIV no sistema com 5% de O₂ 20% de O₂ = CIV no sistema com 20% de O₂

Figura 7: Porcentagem média de clivagem e de produção de blastocisto (sete dias após a FIV) de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH e CIV dos embriões em dois sistemas de cultivo.

4.2.2 Verificação da qualidade proporcional do número de células da MCI e do TF nos embriões CIV

No sétimo dia de CIV, após a avaliação da produção de blastocisto, aproximadamente metade dos embriões produzidos em cada grupo foi destinada à verificação da qualidade proporcional do número de células da MCI e do TF. Dos 475 embriões destinados à coloração diferencial, considerando-se uma perda de 46,95% durante o processo de coloração, 252 foram avaliados para se determinar o número médio de células constituintes da massa celular interna (MCI) e do trofoblasto (TF) e, do total de células do embrião (T) (Figura 8). As porcentagens médias das variáveis avaliadas (MCI, TF e T) estão dispostas na Tabela 4 e na Figura 9.

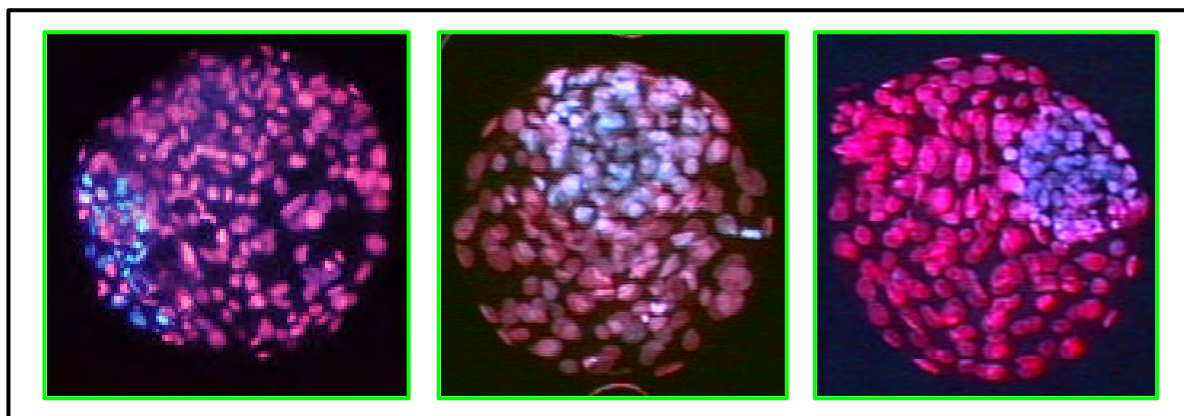


Figura 8: Blastocistos (sete dias após a FIV) avaliados pela técnica de coloração diferencial sob microscopia de epifluorescência. Azul (Hoechst 33342): núcleo de células da massa celular interna; Vermelho (iodeto de propídio): núcleo das células do trofoblasto. Imagens digitalizadas.

Os grupos BC e BCC, cultivados no sistema com 20% de O₂, apresentaram as menores porcentagens médias de células na MCI e, as maiores no TF ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (S), como também aos grupos BC e BCC cultivados no sistema com 5% de O₂ (Tabela 4 e Figura 9).

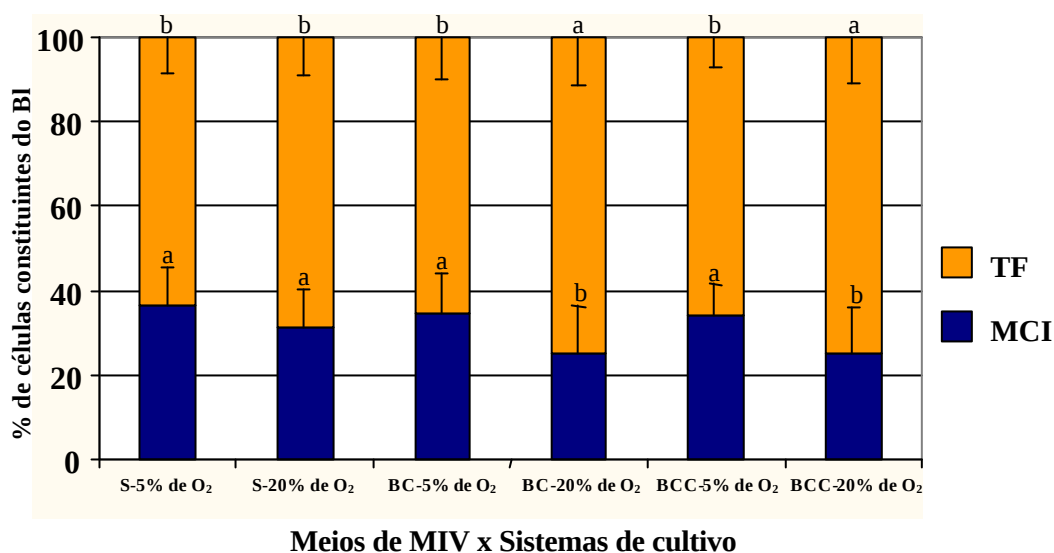
Já na variável T houve interação entre os grupos e o sistema de cultivo ($p = 4,13\%$); portanto esta variável só pode ser analisada dentro de cada nível, ou seja, somente entre grupos ou entre as tensões de O₂. Desta forma, nenhuma das porcentagens médias das variáveis avaliadas em nenhum dos níveis (meios de MIV ou sistema de cultivo) apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 4: Número de blastocistos (sete dias após a FIV) e porcentagem média de células da MCI e do TF, em relação ao número total de células dos blastocistos produzidos de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH, e CIV dos embriões em dois sistemas de cultivo

Grupo de MIV	Sistema de cultivo	Nº de blastocistos	% média de células		Nº médio de células totais ($\pm$ SD)
			MCI (% $\pm$ SD)	TF (% $\pm$ SD)	
S	5% de O ₂	43	36,71 $\pm$ 8,77 ^a	63,29 $\pm$ 8,77 ^b	84 $\pm$ 31,44
	20% de O ₂	49	31,26 $\pm$ 8,93 ^a	68,75 $\pm$ 8,93 ^b	70 $\pm$ 23,37
BC	5% de O ₂	38	34,54 $\pm$ 9,78 ^a	65,46 $\pm$ 9,78 ^b	73 $\pm$ 30,68
	20% de O ₂	37	24,96 $\pm$ 11,38 ^b	75,04 $\pm$ 11,38 ^a	69 $\pm$ 21,87
BCC	5% de O ₂	42	34,01 $\pm$ 7,56 ^a	65,99 $\pm$ 7,56 ^b	71 $\pm$ 26,45
	20% de O ₂	43	24,95 $\pm$ 10,82 ^b	75,05 $\pm$ 10,82 ^a	79 $\pm$ 29,32
Subtotal	5% de O ₂	123	35,09%	64,91%	76
	20% de O ₂	129	27,06%	72,95%	73
Total	-	252	31,07%	68,93%	75

Valores seguidos de letras diferentes, dentro de cada coluna, diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

S = TCM-199b + 10% de SFB BC = meio B + cisteína (0,825mM) BCC = meio BC + cisteamina (100 μ M)
 5% de O₂ = CIV no sistema com 5% de O₂ 20% de O₂ = CIV no sistema com 20% de O₂



Letras diferentes, dentro de cada variável, diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

S = TCM-199b + 10% de SFB BC = meio B + cisteína (0,825mM) BCC = meio BC + cisteamina (100 μ M)
 5% de O₂ = CIV no sistema com 5% de O₂ 20% de O₂ = CIV no sistema com 20% de O₂

Figura 9: Porcentagem média de células da MCI e do TF do total de células dos blastocistos produzidos de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH, e CIV dos embriões em dois sistemas de cultivo.

Para se avaliar melhor os resultados do Experimento II, os dados foram reavaliados segundo critérios inerentes à variável analisada, na verificação da qualidade proporcional MCI:TF e na avaliação do número de células em apoptose, como segue.

Baseado nas médias gerais aproximadas do número de células da MCI (24), do TF (51) e do T (75) e, na proporção de células MCI:TF $\geq$ 1:2, os blastocistos foram classificados em embriões de qualidade superior ou inferior (Tabela 5 e Figura 10). Estas médias utilizadas foram obtidas dos dados deste trabalho, servindo apenas para avaliar os resultados deste experimento.

De forma geral, todos os grupos cultivados em baixa tensão de O₂ demonstraram maior frequência de embriões com maior MCI e TF e proporção MCI:TF $\geq$ 1:2 maiores que suas médias gerais; já, com relação à variável T, não houve diferença estatística entre os grupos (p>0,05).

Tabela 5: Frequência (%) média de blastocistos de qualidade superior (MCI>24; TF>51; T>75 e MCI:TF $\geq$ 1:2) produzidos de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH, e CIV dos embriões em dois sistemas de cultivo

Grupo de MIV	Sistema de cultivo	Frequência (%) de BI de qualidade superior			
		MCI>24	TF>51	T>75	MCI:TF $\geq$ 1:2
S	5% de O ₂	65,12 (28/43) ^a	41,86 (18/43) ^{ab}	51,16 (22/43)	69,77 (30/43) ^a
	20% de O ₂	38,78 (19/49) ^b	34,69 (17/49) ^b	36,73 (18/49)	46,94 (23/49) ^c
BC	5% de O ₂	52,63 (20/38) ^{ab}	31,58 (12/38) ^b	42,11 (16/38)	52,63 (20/38) ^{ac}
	20% de O ₂	29,73 (11/37) ^b	48,65 (18/37) ^{ab}	37,84 (14/37)	21,62 (8/37) ^b
BCC	5% de O ₂	47,62 (20/42) ^{ab}	35,71 (15/42) ^b	42,86 (18/42)	52,38 (22/42) ^{ac}
	20% de O ₂	34,88 (15/43) ^b	55,81 (24/43) ^a	55,81 (24/43)	23,26 (10/43) ^b
Subtotal	5% de O ₂	55,28 (68/123)	36,59 (45/123)	45,53 (56/123)	58,54 (72/123)
	20% de O ₂	34,88 (45/129)	45,74 (59/129)	43,41 (56/129)	31,78 (41/129)
Total	-	44,84 (113/252)	41,27 (104/252)	44,44 (112/252)	44,84 (113/252)

Valores seguidos de letras diferentes, dentro de cada coluna, diferem significativamente entre si (p<0,05).

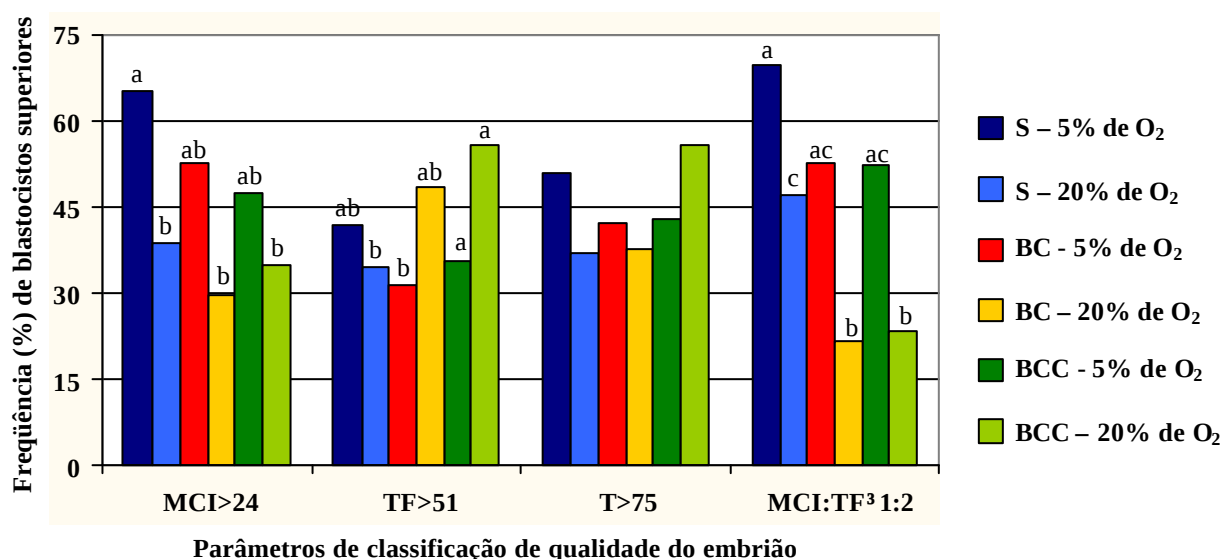
S = TCM-199b + 10% de SFB BC = meio B + cisteína (0,825mM) BCC = meio BC + cisteamina (100μM)

5% de O₂ = CIV no sistema com 5% de O₂

20% de O₂ = CIV no sistema com 20% de O₂

T = total de células constituintes do embrião

MCI:TF = proporção MCI:TF



Letras diferentes, dentro de cada variável, diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

S = TCM-199b + 10% de SFB BC = meio B + cisteína (0,825mM) BCC = meio BC + cisteamina (100μM)
 5% de O₂ = CIV no sistema com 5% de O₂ 20% de O₂ = CIV no sistema com 20% de O₂

Figura 10: Frequência (%) média de blastocistos de qualidade superior (MCI>24; TF>51; T>75 e MCI:TF³≥1:2) produzidos de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH, e CIV dos embriões em dois sistemas de cultivo.

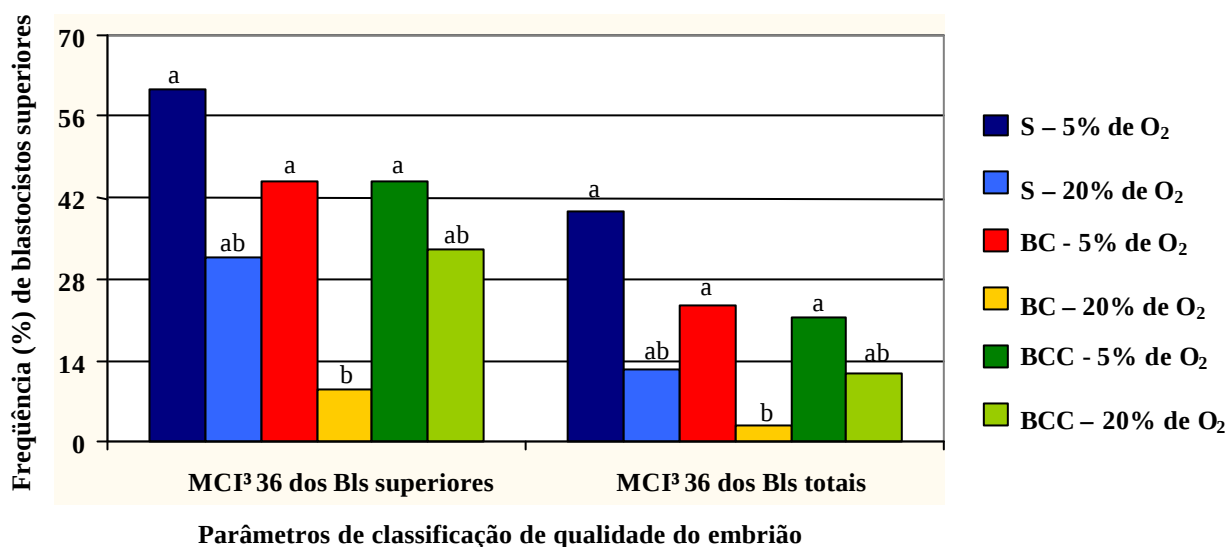
Ainda, estes blastocistos de qualidade superior foram reclassificados em embriões excelentes (≥36 células) ou bons (24 a 35 células), baseado na somatória da média geral aproximada do número de células da MCI (24) e do desvio padrão aproximado (12) (Tabela 6 e Figura 11). O grupo BC, cultivado no sistema com 20% de O₂, apresentou a menor frequência de embriões excelentes, em relação aos outros grupos ($p < 0,05$).

Tabela 6: Frequência (%) média de blastocistos excelentes ($MCI \geq 36$) dos blastocistos de qualidade superior ou do total de blastocistos produzidos de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH, e CIV dos embriões em dois sistemas de cultivo

Grupo de MIV	Sistema de cultivo	Frequência (%) de Bl de qualidade excelente	
		$MCI \geq 36$ dos Bls superiores	$MCI \geq 36$ dos Bls totais
S	5% de O_2	60,71 (17/28) ^a	39,53 (17/43) ^a
	20% de O_2	31,58 (6/19) ^{ab}	12,24 (6/49) ^{ab}
BC	5% de O_2	45,00 (9/20) ^a	23,68 (9/38) ^a
	20% de O_2	9,09 (1/11) ^b	2,70 (1/37) ^b
BCC	5% de O_2	45,00 (9/20) ^a	21,43 (9/42) ^a
	20% de O_2	33,33 (5/15) ^{ab}	11,63 (5/43) ^{ab}
Subtotal	5% de O_2	51,47 (35/68)	28,46 (35/123)
	20% de O_2	26,67 (12/45)	9,30 (12/129)
Total	-	41,59 (47/113)	18,65 (47/252)

Valores seguidos de letras diferentes, dentro de cada coluna, diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

S = TCM-199b + 10% de SFB BC = meio B + cisteína (0,825mM) BCC = meio BC + cisteamina (100 μ M)
 5% de O_2 = CIV no sistema com 5% de O_2 20% de O_2 = CIV no sistema com 20% de O_2



Letras diferentes, dentro de cada variável, diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

S = TCM-199b + 10% de SFB BC = meio B + cisteína (0,825mM) BCC = meio BC + cisteamina (100 μ M)
 5% de O_2 = CIV no sistema com 5% de O_2 20% de O_2 = CIV no sistema com 20% de O_2

Figura 11: Frequência (%) média de blastocistos excelentes ($MCI \geq 36$) dos blastocistos de qualidade superior ou do total de blastocistos produzidos de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH, e CIV dos embriões em dois sistemas de cultivo.

Com estas duas classificações, pode-se avaliar a frequência de produção de blastocisto de melhor qualidade dentro de cada grupo experimental, onde o grupo S, cultivado no sistema com 5% de O₂, foi numericamente superior aos outros (Tabelas 5 e 6 e Figuras 10 e 11).

4.2.3 Avaliação do número de células em apoptose dos embriões CIV

Como na avaliação da qualidade proporcional entre MCI e TF (item 4.2.2), no sétimo dia de CIV, dos 461 embriões destinados à coloração TUNEL, considerando-se as perdas (9,41%) durante o processo de coloração, 434 foram avaliados para se verificar a porcentagem média de células em apoptose pertencentes à MCI e ao TF, em relação ao total do embrião e ao T (Figura 12). As porcentagens médias das células da MCI, do TF e do T com lesão no DNA estão dispostas na Tabela 7 e nas Figuras 13 e 14.

Vale ressaltar que a localização das células em apoptose foi estimada, pois não há como ter certeza, já que a distinção é feita pela aparência das células, onde as células da MCI apresentam-se mais concentradas em um pólo do embrião.

De forma geral, todos os grupos, cultivados no sistema com 5% de O₂, apresentaram maiores porcentagens médias de células em apoptose com relação à variável MCI.

Houve interação entre os grupos e o sistema de cultivo nas variáveis porcentagem de células em apoptose no TF ($p=7,61\%$) e no T ($p=16,82\%$) e, da média de células por blastocisto ($p=6,67\%$); portanto estas variáveis só puderam ser analisadas dentro de cada nível (meios de MIV ou sistemas de cultivo).

Desta forma, o grupo BCC apresentou numericamente menor número de células em apoptose no TF e no T, dentro dos meios de MIV; já o número de células em apoptose no TF, dentro do sistema de cultivo, não apresentou diferença estatística ($p>0,05$), mas o no T no sistema com 5% de O₂ causou lesão em mais células, em relação ao sistema com 20% de O₂ ($p<0,05$) (Tabela 7 e Figura 14).

Com relação ao número médio de células por blastocisto, os grupos S, BC e BCC não diferiram entre si ($p<0,05$), dentro dos meios de MIV, mas o sistema com 5% de O₂ produziu maiores embriões (embriões com mais células) em relação ao sistema com 20% de O₂ ($p<0,05$) (Tabela 7 e Figura 15).

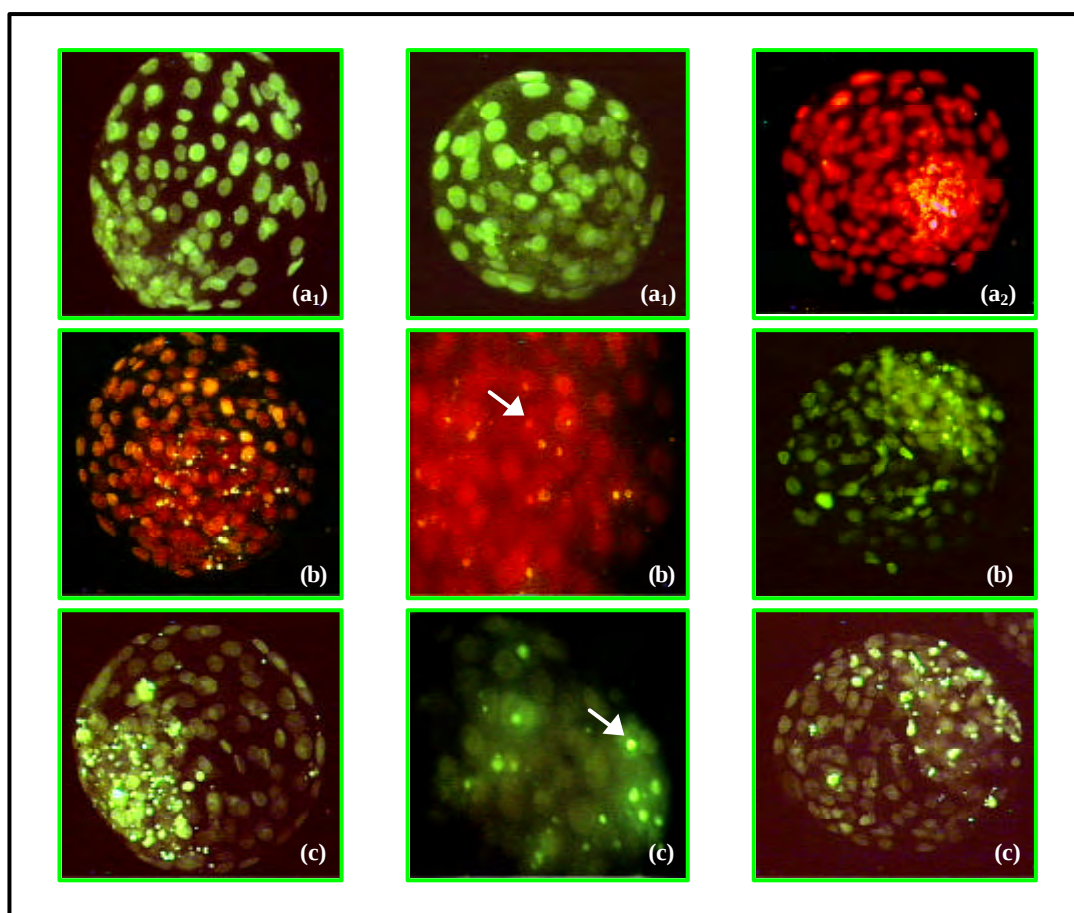


Figura 12: Blastocistos (sete dias após a FIV) avaliados pela técnica de coloração TUNEL, sob microscopia de epifluorescência. **(a)** controles: **(a₁)** positivo (tratados com DNase I) e **(a₂)** negativo (incubação na ausência da TdT); **(b)** blastocistos com poucas células em apoptose. **(c)** blastocistos com muitas células em apoptose; **(seta)** local da fragmentação do DNA no núcleo das células em apoptose. Verde (FITC): núcleo de células em apoptose; Vermelho (iodeto de propídio): núcleos de células constituintes do embrião. Imagens digitalizadas.

Tabela 7: Número de blastocistos (sete dias após a FIV), porcentagem e número médios de células em apoptose (presentes na MCI, no TF e T) e tamanho (número médio de células/blastocisto) dos blastocistos produzidos de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH, e CIV dos embriões em dois sistemas de cultivo

Grupo de MIV	Sistema de cultivo	Nº de Bls	% média de células em apoptose $\pm$ SD (nº médio)			Nº de células/Bl (% $\pm$ SD)
			MCI	TF	T	
S	5% de O ₂	79	8,40 $\pm$ 4,79(7) ^a	5,32 $\pm$ 5,11(4)	13,72 $\pm$ 6,68(11)	87 $\pm$ 26
	20% de O ₂	73	6,03 $\pm$ 4,08(5) ^b	5,44 $\pm$ 6,33(4)	11,47 $\pm$ 8,24(9)	77 $\pm$ 26
BC	5% de O ₂	69	8,62 $\pm$ 3,83(7) ^a	7,38 $\pm$ 6,43(5)	16,00 $\pm$ 6,20(12)	82 $\pm$ 25
	20% de O ₂	73	6,45 $\pm$ 3,60(5) ^b	4,91 $\pm$ 4,87(4)	11,37 $\pm$ 6,72(9)	83 $\pm$ 26
BCC	5% de O ₂	67	7,32 $\pm$ 4,35(7) ^{ab}	4,55 $\pm$ 4,64(4)	11,87 $\pm$ 6,61(11)	91 $\pm$ 27
	20% de O ₂	73	5,64 $\pm$ 2,95(4) ^b	4,37 $\pm$ 3,86(3)	10,01 $\pm$ 5,43(7)	79 $\pm$ 23
Total	5% de O ₂	215	8,13 $\pm$ 4,23(7)	5,74 $\pm$ 5,54(4)	13,88 $\pm$ 6,69(11)	87 $\pm$ 26
	20% de O ₂	219	6,04 $\pm$ 3,58(5)	4,91 $\pm$ 5,11(4)	10,95 $\pm$ 6,90(9)	80 $\pm$ 25
Total	-	434	7,09 $\pm$ 7,81(6)	5,33 $\pm$ 5,33(4)	12,42 $\pm$ 6,80(10)	84 $\pm$ 26

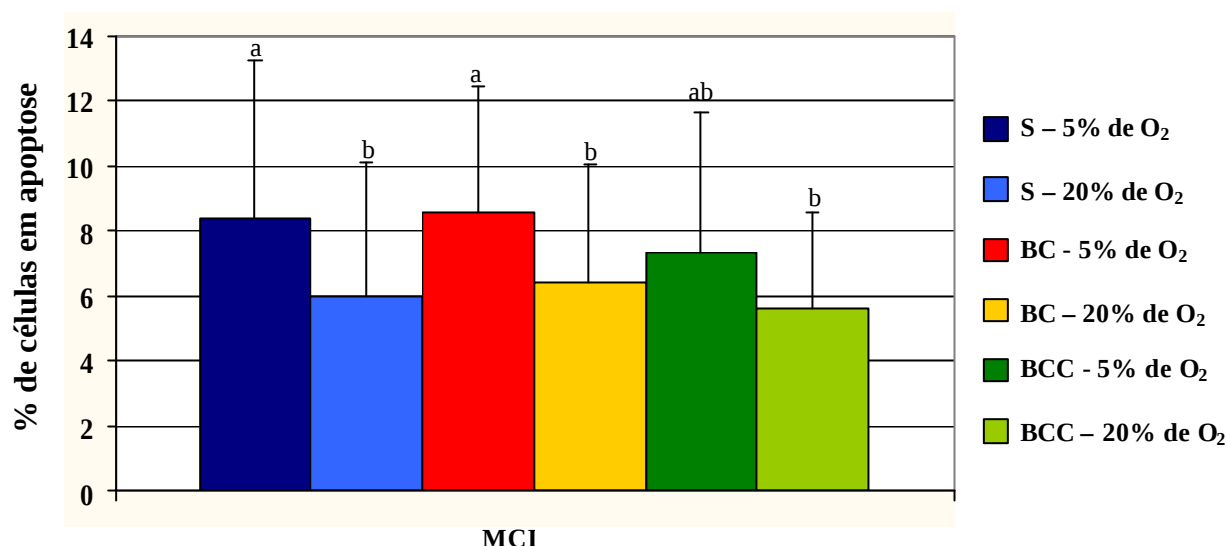
Valores seguidos de letras diferentes, dentro de cada coluna, diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

S = TCM-199b + 10% de SFB BC = meio B + cisteína (0,825mM) BCC = meio BC + cisteamina (100 μ M)

5% de O₂ = CIV no sistema com 5% de O₂

20% de O₂ = CIV no sistema com 20% de O₂

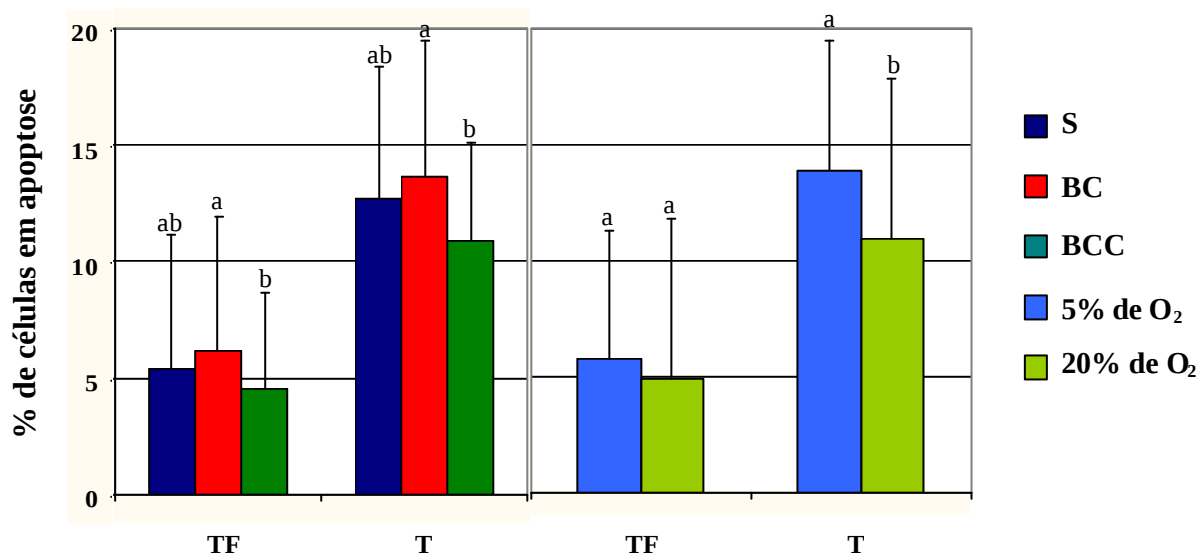
T = total de células constituintes do embrião



Letras diferentes, dentro de cada variável, diferem significativamente entre si (p < 0,05).

S = TCM-199b + 10% de SFB BC = meio B + cisteína (0,825mM) BCC = meio BC + cisteamina (100μM)
 5% de O₂ = CIV no sistema com 5% de O₂ 20% de O₂ = CIV no sistema com 20% de O₂

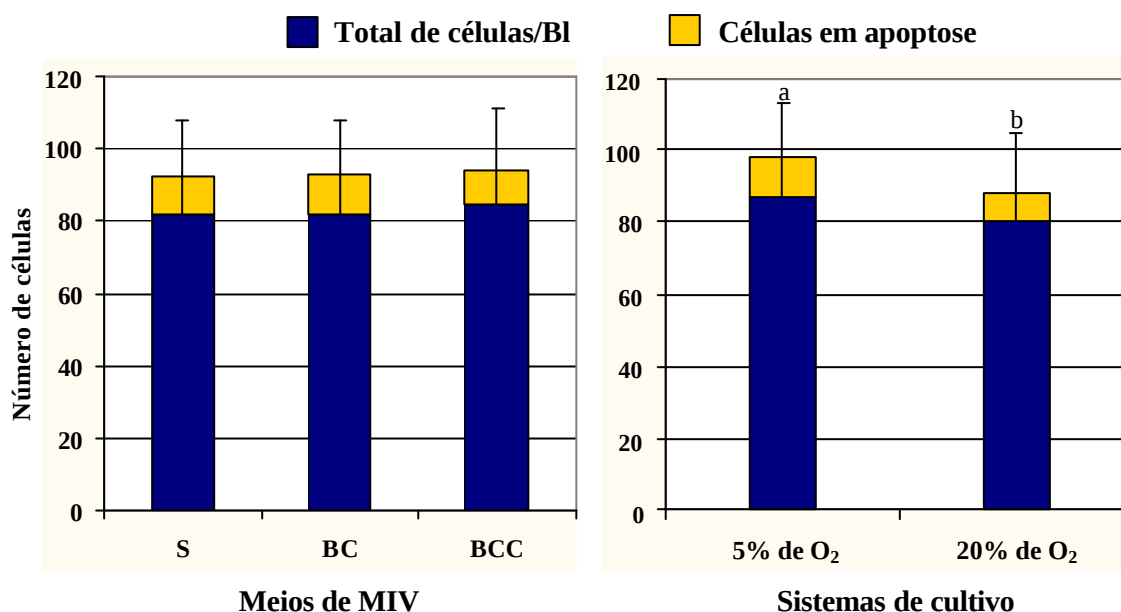
Figura 13: Porcentagem média de células em apoptose presentes na MCI dos blastocistos produzidos de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH, e CIV dos embriões em dois sistemas de cultivo.



Letras diferentes, dentro de cada variável, diferem significativamente entre si (p < 0,05).

S = TCM-199b + 10% de SFB BC = meio B + cisteína (0,825mM) BCC = meio BC + cisteamina (100μM)
 5% de O₂ = CIV no sistema com 5% de O₂ 20% de O₂ = CIV no sistema com 20% de O₂
 TF = trofoblasto T = total de células constituintes do embrião

Figura 14: Porcentagem média de células em apoptose presentes na MCI dos blastocistos produzidos de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH, e CIV dos embriões em dois sistemas de cultivo.



Letras diferentes, dentro de cada variável, diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

S = TCM-199b + 10% de SFB BC = meio B + cisteína (0,825mM) BCC = meio BC + cisteamina (100 μ M)
 5% de O₂ = CIV no sistema com 5% de O₂ 20% de O₂ = CIV no sistema com 20% de O₂

Figura 15: Número médio total de células em apoptose, presentes na MCI e no TF, em relação ao tamanho (número médio de células/Bl) dos blastocistos produzidos de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH, e CIV dos embriões em dois sistemas.

Para melhor se avaliar os resultados, como na avaliação da qualidade proporcional entre MCI:TF (item 4.2.2), os blastocistos foram classificados em embriões de qualidade superior (<10 células em apoptose e número total de células >83) ou inferior, baseado na média geral aproximada de células com apoptose no embrião como um todo (MCI+TF=10) e na média total aproximada de células constituintes do embrião (T=83) (Tabela 8 e Figura 16).

Tabela 8: Frequência (%) média de blastocistos de qualidade superior (com menos de dez células em apoptose e blastocistos maiores de 83 células) produzidos de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH, e cultivo *in vitro* dos embriões em dois sistemas de cultivo

Grupo de MIV	Sistema de cultivo	Frequência (%) de Bl de qualidade superior	
		MCI+TF<10 células em apoptose	T>83 células
S	5% de O ₂	41,77 (33/79) ^b	50,63 (40/79) ^{ab}
	20% de O ₂	67,12 (49/73) ^a	41,10 (30/73) ^b
BC	5% de O ₂	27,54 (19/69) ^b	47,83 (33/69) ^b
	20% de O ₂	64,38 (47/73) ^a	49,32 (36/73) ^b
BCC	5% de O ₂	43,28 (29/67) ^b	67,16 (45/67) ^a
	20% de O ₂	76,71 (56/73) ^a	42,47 (31/73) ^b
Subtotal	5% de O ₂	37,67 (81/215)	54,88 (118/215)
	20% de O ₂	69,41 (152/219)	44,29 (97/219)
Total	-	53,69 (233/434)	49,54 (215/434)

Valores seguidos de letras diferentes, dentro de cada coluna, diferem significativamente entre si (p<0,05).

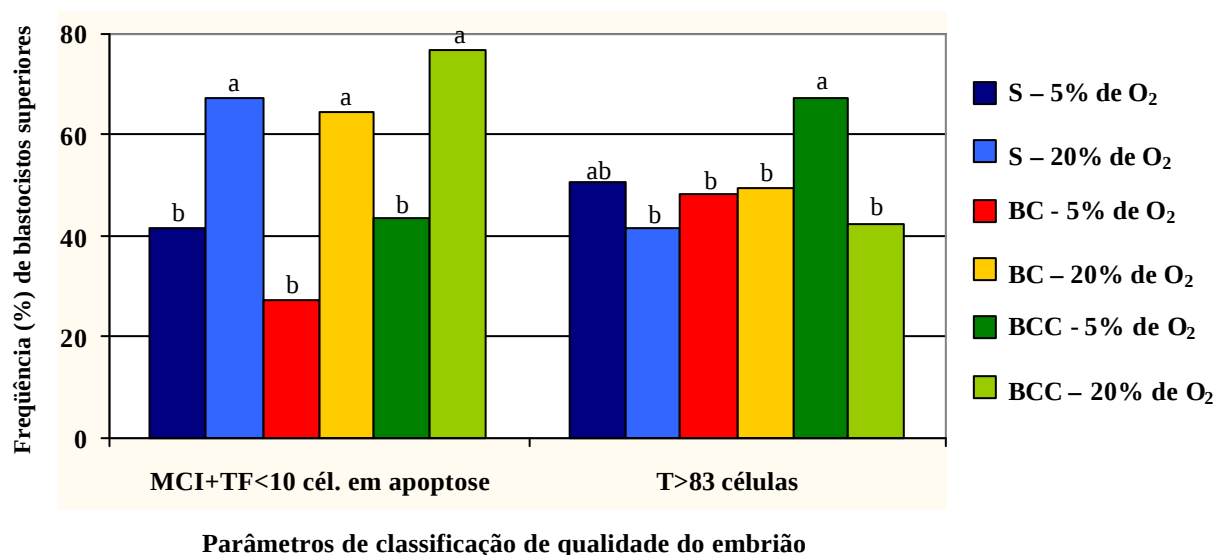
S = TCM-199b + 10% de SFB BC = meio B + cisteína (0,825mM) BCC = meio BC + cisteamina (100µM)

5% de O₂ = CIV no sistema com 5% de O₂

20% de O₂ = CIV no sistema com 20% de O₂

MCI+TF = células em apoptose da MCI + do TF

T = total de células constituintes do embrião



Letras diferentes, dentro de cada variável, diferem significativamente entre si ($p<0,05$).

S = TCM-199b + 10% de SFB BC = meio B + cisteína (0,825mM) BCC = meio BC + cisteamina (100 μ M)
 5% de O₂ = CIV no sistema com 5% de O₂ 20% de O₂ = CIV no sistema com 20% de O₂

Figura 16: Frequência (%) média de blastocistos de qualidade superior (com menos de dez células em apoptose e blastocistos maiores de 83 células) produzidos de oócitos MIV, por 24h, em três meios contendo ou não estimuladores da síntese de GSH, e cultivo *in vitro* dos embriões em dois sistemas de cultivo.

Como a classificação foi conduzida, pode-se avaliar a frequência de produção de blastocistos de melhor qualidade (superiores) em cada grupo experimental, onde todos os grupos cultivados no sistema com 20% de O₂ apresentaram maior frequência de blastocistos superiores ($p<0,05$) em relação aos cultivados no sistema com 5% de O₂ (somatória MCI+TF<10 células em apoptose). Já com relação ao tamanho do embrião, o grupo BCC cultivado no sistema com 5% de O₂ apresentou maior frequência de embriões superiores (T>83 células) (Tabelas 7 e 8 e Figuras 13, 14, 15 e 16).

Discussão

5 DISCUSSÃO

A literatura mostrou uma certa divergência entre os pesquisadores quanto à utilização de componentes de thiol somente no meio de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos para melhorar a produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos. No entanto, uma observação que todos concordaram é que estes componentes elevam a concentração intracelular de glutathione (GSH) nos oócitos durante a MIV, bem como não interferem na taxa de clivagem, melhorando ou não a taxa de desenvolvimento e a qualidade embrionária (maior número de células no blastocisto e menor número de células em apoptose).

5.1 Experimento I: Influência da adição de aditivos no meio de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos

Este experimento foi realizado com o intuito de se verificar se a adição de componentes de thiol, cisteína e/ou cisteamina, ou a associação destes com uma mistura contendo insulina, transferrina e selênio (ITS) seria capaz de melhorar a MIV de oócitos bovinos, em relação a dois controles (grupos S e B). Com estes resultados escolheu-se dois melhores meios para a realização do Experimento II, juntamente com o meio controle do laboratório (S).

5.1.1 Avaliação da maturação oocitária

Como descrito por Edwards (1965) apud Abeydeera et al. (1998), oócitos removidos dos folículos e mantidos em condições favoráveis de cultivo *in vitro* (CIV) apresentam maturação nuclear espontânea (retomada da meiose até o estágio de metáfase II) em percentual elevado, o que foi verificado neste experimento ($\bar{x}=99,17\%$).

Por outro lado, a maturação citoplasmática nem sempre é garantida pela nuclear (Tribaut, 1977 apud Abeydeera et al., 1998), já que as condições de cultivo podem influenciar a MIV dos oócitos (Krisher & Bavister, 1998). Neste experimento foi observado que a migração dos grânulos corticais (GCs) para a periferia da membrana citoplasmática, um dos parâmetros utilizados para se avaliar a maturação citoplasmática dos oócitos, se mostrou coincidente com o estágio de metáfase I, ou seja, todos os oócitos com GCs dispostos em sua

periferia também estavam em metáfase II, sugerindo que a maturação citoplasmática pode depender da nuclear.

Entretanto, neste trabalho, observou-se também uma elevada taxa de migração dos GCs para a periferia ($\bar{x}=93,34\%$) entre todos os grupos, não havendo diferença estatística entre eles, diferindo dos achados de Avelino (2004), que encontrou uma maior taxa desta migração nos oócitos MIV apenas na presença de β -mercaptoetanol ($100\mu\text{M}$) e/ou de cisteamina ($100\mu\text{M}$). De forma semelhante a outros autores (De Matos et al., 1996, 2002a; Abeydeera et al., 1998; Gasparrini et al., 2000, 2003; Jeong & Yang, 2001; Van Soom et al., 2002) descreveram que a adição de estimuladores da síntese de GSH intracelular no meio de MIV melhora a maturação citoplasmática.

Embora, o grupo BCCI não tenha apresentado diferença estatística ($p>0,05$), observou-se que foi o grupo com menor taxa média de migração dos GCs para a periferia e grande variação (desvio padrão), o que garantiu tal semelhança com os outros grupos.

Durante a maturação citoplasmática ocorrem alterações estruturais e bioquímicas no oócito, dando-lhe condições para participar eficientemente do processo de fecundação e do desenvolvimento embrionário inicial. Além da migração dos GCs para a periferia do oócito (Damiani et al., 1996; Carneiro et al., 2002), a dosagem de GSH intracelular estocada (De Matos et al., 1995, 1996) pode ser um parâmetro utilizado para se avaliar a MIV de oócitos, ambos usados neste experimento.

5.1.2 Mensuração da concentração intracelular de GSH dos oócitos MIV

A GSH é um tripeptídeo fundamental para a proteção celular contra o estresse oxidativo e participa ativamente dos processos de maturação oocitária (Knapen et al., 1999; Abeydeera et al., 1998, 1999). A MIV dos oócitos foi também avaliada pela mensuração da GSH intracelular estocada, como descrito por De Matos et al. (1995, 1996), demonstrando que, apesar de haver a migração dos GCs para a periferia do oócito em elevada proporção (93,34%) em todos os grupos, a eficiência de estocagem de GSH intracelular variou; portanto, os oócitos com maior concentração de GSH intracelular podem apresentar melhor qualidade de maturação, adquirindo melhores condições para enfrentar os eventos posteriores (FIV e CIV).

A biosíntese de GSH pelo ciclo γ -glutamil é dependente da disponibilidade de L-cisteína no meio de cultivo, mas a cisteína é muito instável no meio (Bannai, 1984 apud De Matos et al., 1995; Sagara et al., 1993), necessitando de precursores da GSH (cisteamina ou β -mercaptoetanol) para lhe dar estabilidade, disponibilizando-a no meio de cultivo.

O meio utilizado para a MIV dos oócitos foi o TCM-199, cuja composição é de cisteína (0,6 μ M) e cistina (83,2 μ M). Segundo De Matos & Furnus (2000), esta baixa concentração de cisteína ainda sofre autooxidação em cistina, indisponível à célula, limitando a síntese de GSH intracelular pela carência de cisteína.

O SFB pode causar alterações bioquímicas no meio e interferir no sistema de cultivo e, segundo Bavister et al. (1992), as albuminas do soro podem se ligar aos componentes de thiol indisponibilizando-os no meio. Desta forma, para se evitar a interferência do SFB na ação dos componentes de thiol avaliados, os meios adicionados destes componentes foram suplementados apenas com BSA (0,5%), dando condições semidefinidas ao meio de maturação, embora outros autores (De Matos et al., 1996, 2002a,b) adicionaram estes componentes em meio de MIV suplementado com SFB e obtiveram resultados positivos..

Os resultados deste experimento demonstraram que a adição de cisteína no meio de MIV, associada ou não à cisteamina, promoveu uma elevação da concentração intracelular de GSH no oócito, corroborando com os dados da literatura nas espécies bovina (De Matos et al., 1996, 2002a; Van Soom et al., 2002; Avelino, 2004), suína (Abeydeera et al., 1998; Jeong & Yang, 2001), bubalina (Gasparrini et al., 2000, 2003), ovina (De Matos et al., 2002b), hamsters (Zuelke, 2003) e caprina (Rodríguez-González et al., 2003). Ainda, os grupos que não apresentaram a cisteína em sua composição, com exceção do grupo BCI, tiveram as menores concentrações de GSH intracelular, demonstrando que a biosíntese no oócito realmente é limitada pela presença de L-cisteína no meio (Furnus & De Matos, 1999). Além disso, foi observada uma tendência ao aumento da concentração intracelular da GSH nos oócitos maturados na presença de cisteína, se intensificando com a associação da cisteamina.

No entanto, os resultados do grupo BC, onde foi adicionado apenas a cisteína no meio de MIV, demonstraram que a cisteína tem condições de estimular a síntese de GSH intracelular no oócito MIV, com valores semelhantes às das obtidas com a associação com a cisteamina, provavelmente por estar em elevada concentração, não havendo tempo para ser totalmente reduzida à cistina antes de sua ação, contrariando o descrito por Ishii et al (1981), Issels et al. (1988) e Avelino (2004), que desprezaram a necessidade da presença de cisteamina para dar estabilidade à cisteína e disponibilizá-la para o oócito.

Ali et al. (2003) e Zuelke et al. (2003) relataram que a GSH intracelular seria mais importante durante a fecundação do que no desenvolvimento embrionário, baseado na drástica redução do nível de GSH intracelular após a fecundação e na ação negativa de antioxidantes adicionados nos meios de FIV e de CIV de embriões, contrariando os dispostos por Caamaño et al. (1996), Lim et al. (1996) e Luvoni et al. (1996), que apresentam uma importância da GSH também durante o CIV de embriões. Esta divergência pode ser explicada por Lapointe & Bilodeau (2003), que demonstraram que a presença de espécies reativas de O_2 (ROS) é benéfica para a capacitação espermática e a ligação do espermatozóide à zona pelúcida e, por Miyamura et al. (1995) que relatou que a GSH intracelular estocada no oócito durante a MIV é importante após a penetração do espermatozóide no oócito e para a formação do pronúcleo masculino. Em resumo, o oócito deve estocar GSH intracelular para suportar a FIV e o desenvolvimento embrionário inicial, como descrito por Lim et al. (1996) e De Matos et al. (2002a), mas não pode estar no meio extracelular durante a penetração do espermatozóide no oócito. Posteriormente à fecundação, a GSH restante auxilia no desenvolvimento inicial do embrião, até que ele adquira capacidade de produzir suas próprias proteínas e sistemas antioxidantes.

Se os grupos BCCI e BCI forem comparados, pode-se inferir que o ITS associado à cisteamina não apresentou uma ação estimulatória esperada sobre a síntese intracelular de GSH, pois os piores resultados foram com o ITS apenas em associação com a cisteamina (grupo BCCI).

Ainda, a ausência de uma ação sinérgica do ITS com os componentes de tiol, durante a MIV, provavelmente ocorreu devido sua adição ter sido feita no momento menos propício da PIV de embriões, embora o selênio estimule a síntese de GSH. No entanto, a literatura descreve apenas a adição de ITS no período de desenvolvimento embrionário, onde exerce sua ação positiva (Nasr-Esfahani & Johnson, 1992 apud Lim & Hansel, 2000; Ozolins et al., 1996 apud Lim & Hansel, 2000; Augustin et al., 2003), já que a glicose torna-se a fonte predominante de energia somente após a ativação do genoma embrionário do bovino (Khurana & Niemann, 2000), período onde a insulina, fator que auxilia o transporte de glicose para dentro da célula, poderia ter sua maior ação e importância na PIV.

Contrariamente ao observado na migração dos GCs para a periferia, a presença do ITS associado à cisteamina (grupo BCCI) apresentou ação estimulatória sobre a concentração intracelular de GSH, provavelmente porque a cisteamina promoveu esta ação sem o auxílio do ITS, o que não ocorreu com o grupo BCI que apresentou resultados semelhantes aos grupos controle (S e B). Ainda, o ITS acrescentado no meio de MIV não apresentou efeito adicional à

síntese de GSH intracelular do oócito, embora seja relatado que a insulina estimula a síntese de proteínas (Lewis et al., 1992) e, principalmente, que o selênio também seja estimulante da síntese de GSH (Ozolins et al., 1996 apud Lim & Hansel, 2000) e, a transferrina tenha ação de quelante de radicais hidroxila (Nasr-Esfahani & Johnson, 1992 apud Lim & Hansel, 2000).

A ausência de correlação entre a taxa de migração dos GCs para a periferia e a concentração intracelular de GSH dos oócitos de bovino demonstrou que estes eventos são independentes, mas importantes para a PIV de embriões, corroborando com o descrito por Avelino (2004).

5.2 Experimento II: Avaliação do desenvolvimento e da qualidade de embriões produzidos *in vitro* (PIV), em dois sistemas de cultivo, com oócitos bovinos MIV na presença de componentes de thiol

O objetivo deste experimento foi avaliar o comportamento dos dois melhores meios de MIV (BC e BCC), escolhidos do Experimento I, com relação a sua eficiência em melhorar a quantidade (clivagem e produção de blastocisto) e a qualidade (maior número de células constituintes do embrião e menor número de células em apoptose) embrionária, em relação ao meio controle do laboratório (S), em dois sistemas de CIV de embriões (sistema com 5% ou 20% de O₂).

5.2.1 Quantificação das taxas de clivagem e de desenvolvimento dos embriões CIV

Após a MIV em um dos três meios (S, BC ou BCC), os oócitos de todas as repetições foram fertilizados *in vitro* (FIV) nas mesmas condições e com o mesmo sêmen (touro e partida). Após 24h da FIV, os prováveis zigotos de cada grupo foram divididos igualmente em um dos sistemas de cultivo utilizados (sistema com 5% de O₂ ou 20% de O₂). Estas condições foram mantidas em todas as repetições pois segundo Long et al. (1999), as diferenças nas condições de PIV (composição dos meios de cultivo e qualidade espermática) têm impacto sobre todas as etapas (MIV, FIV e CIV).

Os embriões foram avaliados em dois momentos do desenvolvimento: 48h após a FIV, para se verificar a taxa de clivagem (embriões com duas ou mais células), e no sétimo dia após a FIV, para a determinação da produção de blastocistos. A porcentagem de blastocisto

foi calculada em relação aos oócitos clivados em cada grupo e não sobre o número de oócitos iniciais.

As taxas de clivagem e a de produção embrionária não foram influenciadas pela presença de componentes de tiol nos meios de MIV, apesar do estímulo da síntese e a elevação da concentração da GSH intracelular de oócitos, corroborando com os achados de De Matos et al. (1995), Blondin et al. (1997), Guyarder-Joli et al. (1998), Ali et al. (2003) e Avelino (2004), mas divergindo dos relatos de Takahashi et al. (1993), De Matos et al. (1996, 1997, 2002a, b), Luvoni et al. (1996), Abeydeera et al. (1998, 1999), De Matos & Furnus (2000), Jeong & Yang (2001), Nagai (2001), Van Soom et al. (2002) e Gasparrini et al. (2000, 2003), os quais demonstraram que a cisteína, assim como o β -mercaptoetanol e a cisteamina, utilizados durante a MIV favorecem o desenvolvimento embrionário, pelo estímulo da síntese de GSH nos oócitos, nas espécies bovina, bubalina e suína.

Em pesquisa contraditória, Guyarder-Joli et al. (1998) demonstraram que a alta concentração (250 μ M) de cisteamina durante a MIV pode prejudicar o desenvolvimento embrionário, indicando que o excesso de componentes de tiol no meio, apesar de aumentar a concentração intracelular de GSH nos oócitos e percentual de oócitos com maturação citoplasmática, de alguma forma pode causar desequilíbrio celular e interferir no desenvolvimento embrionário. Ainda, Long & Hallwell (2001) descreveram que as moléculas de tiol são muito instáveis no meio de cultura, podendo provocar a formação de peróxido de hidrogênio, participar na transição de íons metais e se ligar a proteínas específicas por meio de pontes dissulfetos. No entanto, esta observação não pode ser verificada pois se utilizou 100 μ M de cisteamina.

Da mesma forma, o sistema de CIV (sistema com 5% ou 20% de O₂) também não influenciou as taxas de clivagem e de produção de blastocisto, corroborando com o trabalho de Khurana & Niemann (2000), mas contrariando a maioria dos autores (Quim & Harlow, 1978; Bavister, 1989; McKieran & Bavister, 1990; Thompson et al., 1990; Fukui et al., 1991; Voelkel & Hu, 1992; Liu & Foote, 1993, 1995; Nagao et al., 1994; Noda et al., 1994; Wright, 1997; Lonergan et al., 1999; Lim et al., 1999; Fujitani et al., 1997 apud Khurana & Niemann, 2000; Yuan et al., 2003).

Estas observações podem ser explicadas por Long et al. (1999) que previamente descreveram que diferentes composições dos meios de cultivo, assim como a variação da qualidade espermática, tem impacto significativo sobre a produção de embriões, por interferir diretamente na FIV e no CIV de embriões (clivagem e produção embrionária). Neste trabalho,

o meio base de maturação utilizado foi o TCM-199 que apresenta na sua composição a cisteína em baixa concentração ($0,6\mu\text{M}$) e a cistina ($83,2\mu\text{M}$), mas, em decorrência da auto-oxidação da cisteína, sua concentração fica ainda mais reduzida após o preparo e equilíbrio do meio em estufa (uma a duas horas antes da utilização).

Para se evitar a auto-oxidação e disponibilizar cisteína no meio, os meios BC e BCC foram suplementados com $0,825\text{mM}$ de cisteína, previamente determinada por Abeydeera et al. (1998) como a melhor concentração para a MIV de oócitos bovinos. No entanto, não apresentaram melhoria nas taxas de clivagem ou de produção embrionária, como seria esperado, já que é descrito que o estímulo da biosíntese intracelular da GSH aumenta a produção embrionária nas espécies bovina (De Matos et al., 1996, 2002a; Van Soom et al., 2002), ovina (De Matos et al., 2002b), caprina (Rodríguez-González et al., 2003), bubalina (Gasparrini et al., 2000, 2003) e suína (Abeydeera et al., 1998; Jeong & Yang, 2001).

Com a intenção de se manter condições semidefinidas durante a maturação, o meio foi suplementado com BSA ($0,5\%$), em comparação ao SFB. Em estudos anteriores, os precursores de GSH foram utilizados em meios de maturação suplementados com SFB (De Matos et al., 1996; 2002a; 2002b) ou líquido folicular (Abeydeera et al., 1998; 1999; Jeong & Yang, 2001), melhorando a taxa de produção de blastocisto, mas o SFB foi considerado um fluido orgânico não completamente definido, podendo provocar alterações químicas no meio e interferir no sistema de cultivo (Bavister et al., 1992), além de apresentar grandes variações entre as partidas; no entanto, é extensivamente utilizado nos meios de cultivo.

Embora a concentração de radicais livres produzidos nos meios de cultivo utilizados neste trabalho não tenha sido avaliada, os mesmos foram preparados 1h antes do uso, evitando-se que estes ficassem expostos ao O_2 durante a estocagem, o que acarretaria em uma maior formação de radicais livres no meio, que, por sua vez, poderiam interferir negativamente nas condições de CIV utilizadas neste experimento.

5.2.2 Verificação da qualidade proporcional do número de células da MCI e do TF nos embriões CIV

durante o processo da coloração diferencial houve uma perda significativa de embriões ($46,95\%$), onde, dos 475 embriões produzidos, apenas 252 foram avaliados no final do processo. Esta perda ocorreu em dois passos durante a técnica: na remoção da zona pelúcida,

onde os embriões sofreram a ação da pronase ou da solução ácida e, na ligação de anticorpo e complemento, pois podem levar ao rompimento total das células.

Segundo Neuber et al. (2002), com a primeira diferenciação celular, durante o desenvolvimento inicial (quinto ao sexto ciclo), as células da MCI originarão o feto, enquanto o TF dará origem às membranas extra-embrionárias. Desta forma, torna-se interessante que o embrião apresente uma MCI maior, embora uma proporção ideal de MCI:TF, considerada essencial para assegurar a viabilidade embrionária, ainda não tenha sido determinada (Fleming, 1987), mas tem-se adotado valores de 1:2 (Avelino, 2004). Esta qualidade embrionária pode ser avaliada pela coloração diferencial, descrita por Iwasaki et al. (1990), onde se podem quantificar as células da MCI e do TF.

De forma geral, a adição de cisteína, associada ou não à cisteamina não aumentou o percentual de células na MCI nem no tamanho do blastocisto (número total de células), diferindo de Avelino (2004), que demonstrou que a utilização de cisteína, associada ou não à cisteamina aumentou o percentual de células na MCI. Ainda, nos grupos BC e BCC, a adição de cisteína, associada ou não à cisteamina, não teve influência positiva na porcentagem de células na MCI apenas no sistema com 20% de O₂, coincidindo com as menores frequências de produção de blastocistos de qualidade superior (MCI>24 células e MCI:TF≥1:2), embora o número total de células no embrião não tenha sido influenciado nem pelos grupos nem pelo sistema de cultivo.

Com relação ao sistema de cultivo, estes resultados corroboram com os de Yuan et al. (2003), apenas na variável taxa de apoptose, que concluíram que a melhor tensão de O₂ foi a de 5%, para embriões bovinos cultivados em meio SOF, refletindo em menor taxa de apoptose e, diferem dos achados de Van Soom et al. (2002), que observaram que a atmosfera de 5% de O₂ favoreceu o aumento do número de células da MCI.

No entanto, quando foi avaliada a frequência de produção de embriões de qualidade superior (MCI>24 células e MCI:TF≥1:2) e excelentes (MCI≥36 células), se observou que independente do meio de MIV, o sistema de CIV com 5% de O₂ apresentou melhores resultados, com exceção dos parâmetros TF>51 e T>75, corroborando com Thompson et al. (1990), Voelkel & Hu (1992), Liu & Foote (1995), Lim et al. (1999), Van Soom et al. (2002) e Yuan et al. (2003), que demonstraram uma maior frequência de produção de embriões com melhor qualidade em atmosfera de 5% de O₂, e divergindo de Abeydeera et al. (1998), Rodrigues-González et al. (2003) e Avelino (2004) que observaram aumento de blastocistos de qualidade superior apenas quando precursores de GSH foram adicionados ao meio de MIV.

Este efeito promotor do sistema de CIV com 5% de O₂ também foi reportado em camundongo (Quim & Harlow, 1978), hamster (Bavister, 1988; McKieran & Bavister, 1990), suíno (Voelkel & Hu, 1992; Wright, 1997), coelho (Li & Foote, 1993), ovino (Thompson et al., 1990) e humano (Noda et al., 1994).

Ainda, Bicknell & Cohen (1995) apud Yuan et al. (2003) relataram que a alta tensão de O₂ (20%) promoveu elevados níveis de ROS, os quais alteram a conformação e a atividade celular pela ação direta nas quinases e na transcrição e, estão envolvidos na deficiência do desenvolvimento embrionário em condições sub-ideais de cultivo, levando à apoptose no estágio de blastocisto.

Este provável aumento dos níveis de ROS no sistema com 20% de O₂ deveria ser reduzido pela elevada concentração intracelular de GSH, estimulada pela adição de componentes de thiol durante a MIV dos oócitos, melhorando as qualidades dos embriões produzidos, o que não ocorreu neste experimento.

5.2.3 Avaliação do número de células em apoptose dos embriões CIV

A avaliação da taxa de apoptose nos embriões deste experimento corroboram com as descritas em várias espécies, que mostraram que a apoptose é um processo normal observado em 70 a 80% de todos os embriões PIV de camundongo (Handyside e Hunter, 1986) e humano (Hardy et al., 1989) e, principalmente, em 100% dos blastocistos de bovino PIV (Byrne et al., 1999), em taxas maiores ou menores.

Como na avaliação da frequência de produção de embriões de qualidade superior e excelente (item 5.2.2), independente do meio de MIV, o sistema de cultivo com 5% de O₂ apresentou maiores porcentagens médias de células em apoptose com relação à variável MCI, portanto, embriões de qualidade inferior, o que não seria esperado, pois Lonergan et al. (1999) e Van Soom et al. (2002) relataram que a tensão de O₂ no oviduto e útero é menor (5 a 8%) do que no ar (20%), onde 5% de O₂ seria o ambiente mais próximo do fisiológico. Além disso, os embriões CIV no sistema com 5% de O₂ também apresentaram menores frequências médias de blastocistos de qualidade superior (com menos de dez células em apoptose).

Segundo Yuan et al. (2003), a alta tensão de O₂ (20%) promove elevados níveis de ROS, as quais consomem maior quantidade de GSH, alterando a conformação e a atividade celular pela ação direta nas quinases e na transcrição, levando à apoptose no estágio de blastocisto. Ainda, estes mesmos autores observaram que houve uma maior taxa de apoptose

nas tensões extremas de O₂ (2 e 20%) em relação à tensão média (5%), concluindo que a melhor tensão de O₂ é a de 5% para embriões bovinos cultivados em meio SOF, refletindo em maior produção de blastocisto, maior número total de células por embrião e menor taxa de apoptose. Os resultados deste experimento contrariam esta última observação.

Em bovinos, a passagem para o quarto ciclo celular coincide *in vivo* com o período de ativação do genoma. A superação do quarto ciclo celular parece ser um fator essencial para o aumento no número de células totais e da MCI assim como a redução da incidência de apoptose, particularmente na MCI (Knijn et al., 2003). Nestas condições, zigotos com alta concentração de GSH intracelular, armazenada durante o processo de maturação oocitária suportariam melhor o bloqueio embrionário durante o quarto ciclo celular, e os blastocistos apresentariam maior número de células totais (Abeydeera et al., 1998).

No entanto, teoricamente, a adição de antioxidantes exerce uma influência positiva sobre o desenvolvimento embrionário de bovino, aumentando a concentração intracelular de GSH no oócito e o número de células, mas os resultados deste experimento corroboram com os de Van Soom et al. (2002), que não observaram um efeito positivo da GSH sobre as taxas de produção embrionária e redução das células em apoptose, apesar de ter aumentado o número de células na MCI e no total do embrião.

Os resultados desta avaliação também demonstram que há um maior número de células em apoptose na região da MCI em relação à do TF, provavelmente associada ao maior número de células na MCI, em concordância com os estudos de Handyside & Hunter (1986), Byrne et al. (1999), Neuber et al. (2002), Van Soom et al. (2002), Knijn et al. (2003), Yuan et al. (2003), Avelino (2004) e Feugang et al. (2004), podendo ser um processo fisiológico de eliminação das células da MCI com potencial de TF, células inviáveis ou, mais provável, ser apenas para um controle populacional. Este controle da qualidade embrionária na MCI é crítico, uma vez que estas células dão origem ao feto.

Os resultados desta avaliação apresentaram alto desvio padrão em quase todos os parâmetros avaliados, além de não terem sido muito discrepantes. Este fato pode ser explicado pelos experimentos realizados por De Matos et al. (1997) e Nagai (2001), que demonstraram que as células do *cumulus oophorus* são importantes no processo da MIV, pois fazem o transporte da cisteína para o interior do oócito. Com isso, observaram que a adição de precursores de GSH durante a MIV estimulou a síntese intracelular de GSH apenas em oócitos envolvidos pelas células da granulosa, o que não ocorreu com os desnudos. Fato semelhante deve ter ocorrido neste trabalho, pois foram utilizados oócitos de grau I, II e III, distribuídos igualmente entre os grupos. Os oócitos de grau III apresentaram poucas células

da granulosa, o que deve ter interferido na produção total de GSH intracelular, refletindo nos resultados de todos os parâmetros avaliados, sem apresentar diferenças significativas entre os meios de MIV. Além disso, esta grande variação dos dados pode ser devido a utilização de todos os blastocistos produzidos, independente de sua qualidade morfológica.

De forma geral, a adição de componentes de thiol nos meios de cultivo deve observar a qualidade do oócito utilizado e respeitar a importância da GSH em cada fase da PIV de embriões, lembrando que é muito benéfica na MIV, mas não pode estar em excesso ou no meio extracelular durante a FIV, como demonstrado por Lapointe & Bilodeau (2003). Com os resultados deste trabalho, associado à literatura, pode-se sugerir que, além da adição destes estimuladores da síntese de GSH durante a MIV, seria interessante também adicioná-los durante o CIV, para se obter mais embriões e com melhor qualidade.

Por outro lado, provavelmente a GSH estimulada nos grupos BC e BCC supriu as necessidades do oócito em substituição do SFB, pois ainda não se conseguiu fazer uma MIV eficiente de oócitos bovinos sem a presença do SFB.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Com a metodologia empregada neste experimento e os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- 1) A adição de componentes de tiol no meio de maturação *in vitro* (MIV) não elevou as taxas de maturação nuclear e de migração dos grânulos corticais (GCs) para a periferia da membrana citoplasmática do oócito.
- 2) A síntese de glutathiona intracelular em oócitos bovinos, durante a MIV, foi estimulada pela adição de cisteína ao meio de maturação, associada ou não à cisteamina, com exceção de quando na presença de ITS sem a cisteamina.
- 3) A maturação e a estocagem de GSH intracelular oocitárias foram eventos independentes durante a MIV de oócitos bovinos.
- 4) Os componentes de tiol adicionados no meio de MIV de oócitos e os sistemas de cultivo *in vitro* (CIV) não interferiram nas taxas de clivagem e de produção de blastocisto.
- 5) Independente do meio utilizado na MIV de oócitos bovinos, o sistema de cultivo com 5% de O₂ produziu blastocistos com melhor qualidade proporcional MCI:TF, mas com maior quantidade de células em apoptose na região da MCI e no total do embrião.
- 6) Houve uma maior concentração de células em apoptose na região da MCI em relação à do TF.
- 7) Há necessidade de se avaliar a capacidade dos embriões produzidos *in vitro* nestas condições, com maior ou menor número de células na MCI e número de células em apoptose na região da MCI, em promover gestação *in vivo*.

Referências

7 REFERÊNCIAS*

ABEYDEERA, L.R.; WANG, W.H.; CANTLEY, T.C.; PRATHER, R.S.; DAY, B.N. Presence of β -mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocyst development after *in vitro* fertilization. **Theriogenology**, New York, v.50, p.747-56, 1998.

ABEYDEERA, L.R.; WANG, W.H.; CANTLEY, T.C.; PRATHER, R.S.; DAY, B.N. Glutathione content and embryo development after *in vitro* fertilization of pig oocytes matured in the presence of a thiol compound and various concentration of cysteine. **Zigote**, Cambridge, v.7, p.203-10, 1999.

ALI, A.A.; BILODEAU, J.F.; SIRARD, M.A. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and developemnt. **Theriogenology**, New York, v.59, p.939-49, 2003.

ANDERSON, M. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological simples. **Methods in Enzimology**, New York, v.113, p.548-55, 1985.

AUGUSTIN, R.; POCAR, P.; WRENZYCKI, C.; NIEMANN, H.; FICHER, B. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced *in vitro*. **Reproduction**, v.126, p.91-9, 2003.

AVELINO, K.B. **Estimulação e inibição da síntese de glutathione em oócitos bovinos: efeitos sobre a maturação e desenvolvimento embrionário *in vitro***. 2004. 92p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal.

BANAI, S.; CHRISTENSEN, H.N.; VADGAMA, J.V.; ELLOY, J.C.; ENGLASBERG, E.; GUIDOTTI, G.G. Amino acid transport systems. **Nature**, v.311, p.308, 1984.

* VOLPATO, E.S.N.; SILVA, R.C.; PIZZANI, L. Manual de apresentação de trabalho científico: tese, dissertação e monografia. Botucatu: Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação, 2003. 28p.

BAVISTER, B.D. A consistently successful procedure for in vitro fertilization of Golden Hamster eggs. **Gamete Research**, New York, v.23, p.139-158, 1989.

BETTERBED, B.; WRIGHT, T.W.Jr. Development of one-cell ovine embryos in two culture media under two gas atmospheres. **Theriogenology**, New York, v.23, p.547-53, 1985.

BICKNELL, G.R.; COHEN, G.M. Cleavage of DNA the large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun**, New York, v.207, p.40-7, 1995.

BISSELING, J.C.A.; KNAPEN, M.F.C.M.; GOVERDE, H.J.M.; MULDER, T.P.J.; PETERS, W.H.M.; WILLEMSSEN, W.N.P.; THOMAS, C.M.G.; STEGGERS, E.A.P. Glutathione S-transferases in human ovarian follicular fluid. **Fertility and Sterility**, New York, v.68, n.5, p.907-11, 1997.

BRAD, A.M.; BORMANN, C.L.; SWAIN, J.E.; DURKIN, R.E.; JOHNSON, A.E.; CLIFFORD, A.L.; KRISHER, R.L. Glutathione and adenosine triphosphate content of *in vivo* and in vitro matured porcine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.64, p.492-98, 2003.

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

CALVIN, H.I.; GROSSHANS, K.; BLAKE, E.J. Estimation and manipulation of glutathione levels in prepuberal mouse ovaries and ova: relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. **Gamete Research**, New York, v.14, p.265-75, 1986.

CAAMAÑO, J.N., RYOO, J.Y., THOMAS, J.A. β -Mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine *in-vitro*-matured/*in-vitro*-fertilized embryos. **Biology of Reproduction**, New York, v.55, p.1179-86, 1996.

CAAMAÑO, J.N.; RYOO, Z.Y.; YOUNGS, C.R. Promotion of development of bovine embryos produced *in vitro* by addition of cysteine and β -mercaptoethanol to a chemically defined culture system. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.81, p.369-4, 1998.

CARNEIRO, G.F.; LIU, I.K.M.; HYRE, D.; ANDERSON, G.B.; LORENZO, P.L.; BALL, B.A. Quantification and distribution of equine oocyte cortical granules during meiotic maturation and after activation. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.63, p.451-8, 2002.

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

DAMIANI, P.; FISSORE, R.A.; CILELLI, J.B.; LONG, C.R.; BALISE, J.J.; ROBL, J.M.; DUBY, R.T. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.45, p.521-34, 1996.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F.; BALDASSARRE, H. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.42, p.432-36, 1995.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F.; MARTINEZ, A.G.; MATKOVIC, M. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.45, p.451-57, 1996.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes: role of *cumulus* cells. **Biology of Reproduction**, New York, v.57, p.1420-5, 1997.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development: effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology**, New York, v.53, n.3, p.761-71, 2000.

DE MATOS, D.G.; HERRERA, C.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; VAN SOOM, A.; NOGUEIRA, D.; PASQUALINI, R.S. Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine *in vitro* embryo production. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.62, n.2, p.203-9, 2002a.

DE MATOS, D.G.; GASPARRINI, B.; PASQUALINI, S.R.; THOMPSON, J.G. Effect of glutathione stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. **Theriogenology**, New York, v.57, p.1443-51, 2002b.

DOHERTY, A.S.; TEMELES, G.L.; SCHULTZ, R.M. Temporal pattern of IGF-I expression during mouse preimplantation embryogenesis. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.37, p.21-6, 1994.

EDWARDS, R.G. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. **Nature**, London, v.208, p.349-51, 1965.

FERM, V.H.; HANLON, D.P.; WILLHITE, C.C.; CHOY, W.N.; BOOK, S.A. Embryotoxicity and dose-response relationships of selenium in hamsters. **Reproduction Toxicology**, New York, v.4, p.183-90, 1990.

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

FISCHER, B.; BAVISTER, B.D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. **Journal Reproduction and Fertility**, New York, v.99, p.673-9, 1993.

FUJITANI, Y.; KASAI, K.; OHTANI, S.; NISHIMURA, K.; YAMADA, M.; UTSUMI, K. Effect of oxygen concentration and free radicals on *in vitro* development of *in vitro* produced bovine embryos. **Journal Animal Science**, New York, v.75, p.783-9, 1997.

FUKUI, Y.; MCGOWAN, L.T.; JAMES, R.W.; PUGH, P.A.; TERVIT, H.R. Factors affecting the *in vitro* development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. **Journal Reproduction of Fertility**, New York, v.92, p.125-31, 1991.

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

GASPARRINI, B.; NEGLIA, G.; DI PAOLO, R.; CAMPANILE, G.; ZICARELLI, L. Effect of cysteamine during *in vitro* maturation on buffalo embryo development. **Theriogenology**, New York, v.54, p.1537-42, 2000.

GASPARRINI, B.; SAYOUD, H.; NEGLIA, G.; DE MATOS, D.G.; DONNAY, I.; ZICARELLI, L. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development. **Theriogenology**, New York, v.60, p.943-52, 2003.

GORRET, J.O.; KNIJN, H.M.; DIELEMAN, S.J.; AVERY, B.; LARSSON, L.; MADDOX-HYTTEL, P. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. **Biology of Reproduction**, New York, v.69, p.1193-200, 2003.

HALL, A.G. The role of glutathione in the regulation of apoptosis. **European Journal of Clinical Investigation**, Berlin, v.29, p.238-45, 1999.

HANDYSIDE, A.H.; HUNTER, S. Cell division and death in the mouse blastocyst before implantation. **Roux's Archives of developmental Biology**, Berlin, v.195, p.519-26, 1986.

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

HERRLER, A.; KRUSCHE, C.A.; BEIER, H.M. Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. **Biology of Reproduction**, New York, v.59, p.1302-10, 1998.

ISHI, T.; BANNAI, S.; SUGITA, Y. Mecanism of growth stimulation of L1210 cells by 2-mercaptoethanol *in vitro*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.256, n.10, p.12387-92, 1981.

ISSELS R.D.; NAGELE A.; ECKERT, K.G.; WILMANN, W. Promotion of cystine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis induced by cysteamine and N-acetyl-cysteine. **Biochemistry Pharmacology**, New York, v.37, n.5, p. 881-8, 1988.

IWASAKI, S. et al. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.90, p.279-85, 1990.

JEONG, B.S.; YANG, X. Cisteína, glutathione, and percoll treatments improve porcine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.59, p.330-35, 2001.

KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Effects of oocytes quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**, New York, v.54, p.741-56, 2000.

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

KNIJN, H.M.; GJORRET, J.O.; VOS, P.L.A.M.; HENDRIKSEN, P.J.M.; VAN DER WEIJDEN, B.C.; MADDOX-HYTTEL, P.; DIELEMAN, S.J. Consequences of *in vivo* development and subsequent culture on apoptosis, cell number, and blastocyst formation in bovine embryos. **Biology of Reproduction**, New York, v.69, p.1371-78, 2003.

KRISHER, R.L.; BAVISTER, B.D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, New York, v.49, p.103-14, 1998.

LAPORTE, J.; BILODEAU, J.F. Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, New York, v.68, p.1157-64, 2003.

LEWIS, A.M.; KAYE, P.L.; LISING, R.; CAMERON, R.A. Stimulation of protein synthesis and expansion of pig blastocysts by insulin *in vitro*. **Reproduction Fertility Development**, New York, v.4, p.119-23, 1992.

LI, J.; FOOTE, R.H. Culture of rabbit zygotes into blastocysts in protein-free medium with one to twenty percent oxygen. **Journal Reproduction and Fertility**, New York, v.98, p.163-167, 1993.

LIGHTEN, A.D.; MOORE, G.E.; WINSTON, R.M.; HARDY, K. Routine addition of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical invitro fertilization culture. **Human Reproduction**, Oxford, v.13, p.3144-50, 1998.

LIM, J.M.; HANSEL, W. Exogeneous substances affecting development of *in vitro*-derived bovine embryos before and after embryonic genome activation. **Theriogenology**, New York, v.53, p.1081-91, 2000.

LIM, J.M.; LIOU, S.S.; HANSEL, W. Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of β -mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. **Theriogenology**, New York, v.46, p.429-39, 1996.

LIM, J.M.; REGGIO, B.C.; GODKE, R.A.; HANSEL, W. Development of *in-vitro*-derivates bovine embryos cultured in 5% CO₂ in air or in 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂. **Human Reproduction**, Oxford, v.14, p.458-64, 1999.

LITTLELL ROMAN C., MILLIKEN GEORGE A., STROUP WALTER W., WOLFINGER RUSSEL D. **SAS system for Mixed models**. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc., 1996. 633p.

LIU, Z.; FOOTE, R.H. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. **Biology of Reproduction**, New York, v.53, p.786-90, 1995.

LONERGAN, P.; O'KEARNEY-FLYNN, M.; BOLAND, M.P. Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. **Theriogenology**, New York, v.51, p.1565-76, 1999.

LONG, L.H.; EVANS, P.J.; HALLIWELL, B. Hydrogen peroxide in human urine: Implications for antioxidant defense and redox regulation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** V.262, p.605-609, 1999.

LUVONI, G.C.; KENKINTEPE, L.; BRACKETT, B.G. Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione - containing culture media. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.43, p.437-43, 1996.

MAJNO, G.; JORIS I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **Animal Journal Pathology**, v.146, p.3-15, 1995.

MAKAREVICH, A.V.; MARKKULA, M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during *in vitro* maturation and culture. **Biology of Reproduction**, New York, v.66, p.386-92, 2002.

MCGOWAN, K.M.; LONG, S.D.; PEKALA, P.H. Glucose transporter gene expression: regulation of transcription and mRNA stability. **Pharmacology and Therapeutics**, v.66, p.465-505, 1995.

MCKIERNAN, S.H.; BAVISTER, B.D. Environmental variables influencing *in vitro* development of hamster 2-cell embryos to the blastocyst stage. **Biology of Reproduction**, New York, v.43, p.404-13, 1990.

MATSUI, M.; TAKAHASHI, Y.; HISHINUMA, M.; KANAGAWA, H. Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulate the development of bovine embryos fertilized in vitro. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.57, p.1109-11 1995.

MEISTER, A. Selective modification of glutathione metabolism. **Science**, Washington, v.220, p.472-77, 1983.

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

NAGAI, T. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, New York, v.55, n.6, p.1291-1301, 2001.

NAGANO, Y.; SAEKI, K.; HOSHI, M.; KAINUMA, H. Effects of oxygen concentration and oviductal epithelial tissue on the development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes cultured in protein-free medium. **Theriogenology**, New York, v.41, p.681-7, 1994.

NASR-ESFAHANI, M.H.; JOHNSON, M.H. How does transferrin overcome the *in vitro* block to development of the mouse preimplantation embryo. **Journal of Reproduction and Fertility**, New York, v. 96, p.41-8, 1992.

NEUBER, E.; LUETJENS, C.M.; CHAN, A.W.S.; SCHATTEEN, G.M. Analysis of DNA fragmentation of *in vitro* cultured bovine blastocysts using TUNEL. **Theriogenology**, New York, v.57, p.2193-202, 2002.

NODA, Y.; GOTO, Y.; UMAOKA, Y. Culture of human embryos in alpha modification of Eagle's medium under low oxygen tension and low illumination. **Fertility and Sterility**, v.62, p.1022-7, 1994.

OZOLINS, T.R.; SIKSAY, D.L.; WELLS, P.G. Modulation of embryonic glutathione peroxidase activity and phenytoin teratogenicity by dietary deprivation of selenium in D-1 mice. **Journal Pharmacology Experimental Therapy**, v.277, p. 943-53, 1996.

O'NEILL, C. Evidence for the requirement of autocrine growth factors for development of mouse preimplantation embryos *in vitro*. **Biology of Reproduction**, New York, v.56, p.229-37, 1997.

PALMA, G.A.; MULLER, M.; BREM, G. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, New York, v.110, p.347-53, 1997.

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

PERREAULT, S.D.; BARBEE, R.R.; SLOTT, V.I. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. **Developmental Biology**, Orlando, v.125, p.181-86, 1988.

QUINN, P.; HARLOW, G.M. The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos *in vitro*. **Journal Experimental Zoology**, v.206, p.73-80, 1978.

RODRIGUEZ-GONZÁLEZ, E.; LÓPEZ-BEJAR, M.; MERTENS, M.J.; PARAMIO, M.T. Effects on *in vitro* embryo development and intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation of prepubertal goat oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.65, p.446-53, 2003.

SAGARA, J.; MIURA, K.; BANNAY, S. Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture in suspension. **Journal of Neurochemistry**, London, v.61, p.1667-71, 1993.

SAWAI, K.; FUNAHASHI, H.; NIWA, K. Stage-specific requirement of cysteine during *in vitro* maturation of porcine oocytes for glutathione synthesis associated with male pronuclear formation. **Biology Reproduction**, New York, v.57, p.1-6, 1997.

SPANOS, S.; BECKER, D.L.; WINSTON, R.M.; HARDY, K. Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human preimplantation embryo development. **Biology Reproduction**, New York, v.63, p.1413-20, 2000.

TAKAHASHI, M.; NAGAI, T.; HAMANO, S.; KUWAYAMA, M.; OKAMURA, N.; OKANO, A. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. **Biology of Reproduction**, New York, v.49, p.228-32, 1993.

TAKAHASHI, M.; NAGAI, T.; OKAMURA, N.; TAKAHASHI, H.; OKANO, A. Promoting effect of β -mercaptoethanol on *in vitro* development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. **Biology of Reproduction**, New York, v.6, p.562-7, 2002.

THOMPSON, J.G.; SIMPSON, A.C.; PUGH, P.A. Effect of oxygen concentration on *in vitro* development of preimplantation sheep and cattle ova. **Journal Reproduction and Fertility**, New York, v.89, p.573-8, 1990.

TRIBAUT C. Are follicular maturation and oocyte maturation independent process? **Journal Reproduction and Fertility**, New York, v.51, p.1-15, 1977.

VAN SOOM, A.; BOERJAN, M.I.; BOLS, P.E.J.; VANROOSE, G.; LEIN, A.; CORYN, M. Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced *in vivo* after superovulation. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1041-9, 1997.

VAN SOOM, A.; YUAN, Y.Q.; PEELMAN, L.J.; DE MATOS, D.G.; DEWULF, J.; LAESENS, H.; DE KRUIF, A. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. **Theriogenology**, New York, v.57, p.1453-65, 2002.

VOELKEL, S.A.; HU, Y.X. Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems. **Theriogenology**, New York, v.37, p.1117-31, 1992.

YOSHIDA, M.; ISHIGALI, K.; NAGAI, T.; CHIKYU, M.; PURSEL, V.G. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocyte to form male pronucleus. **Biology of Reproduction**, New York, v.49, p.89-94, 1993.

YUAN, Y.Q.; VAN SOOM, A.; COOPMAN, F.O.J.; MINTIENS, K.; BOERJAN, M.L.; VAN ZEVEREN, A.; KRUIF, A.; PEELMAN, L.J. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. **Theriogenology**, New York, v.59, p.1585-96, 2003.

WANG, W.L.; JIANG, H.S.; LU, K.H.; GORDON, I.; POLGE, C. The effect of gas phase on the *in vitro* development of bovine embryos derived from *in vitro* maturation and fertilization of ovarian oocytes. **Theriogenology**, New York, v.37, p.320, 1992. (abstract)

WANG, W.H.; ABEYDEERA, L.R.; CANTLEY, T.C.; DAY BN. Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by *in vitro* fertilization. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.111, n.1, p.101-8, 1997.

WATSON, A.J.; DE SOUSA, P.; CAVENEY, A.; BARCROFT, L.C.; NATALE, D.; URQUHART, J.; WESTHUSIN, M.E. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. **Biology of Reproduction**, v.62, p.355-64, 2000.

WRIGHT, R.W.Jr. Successful culture *in vitro* of swine embryos to the blastocyst stage. **Journal Animal Science**, v.44, p.854-8, 1977.

XIA, P.; TEKPETEY, F.R.; ARMSTRONG, D.T. Effect of IGF-I on pig oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development *in vitro*, and on granulosa and cumulus cell biosynthetic activity. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.38, p.373-9, 1994.

ZUELKE, K.A.; JEFFAY, S.C.; ZUCKER, R.M.; PERREAULT, S.D. Glutathione (GSH) concentration vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, and pre-implantation stage embryos. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.64, p.106-12, 2003.

Anexos

ANEXOS

ANEXO A: Meio de Lavagem de Oócitos (TCM 199 Hepes)

Solução Mãe TCM 199 Hepes	Localização	10mL	50mL
Água Milli-Q	-	10mL	50mL
TCM 199	Dessecador - Geladeira	0,095g	0,475g
Bicarbonato de Sódio (5mM)	Armário	0,0042g	0,021g
Hepes Sódico (10mM)	Geladeira (4°C)	0,026g	0,130g
Hepes Ácido (10mM)	Geladeira (4°C)	0,024g	0,120g

Adicionar os componentes na ordem em que aparecem, filtrar em membrana de 0,22µm.

Meio de Lavagem	Localização	10mL	50mL
Solução Mãe TCM 199 Hepes	Geladeira (4°C)	9mL	45mL
Estoque C (Piruvato) (anexo J)	Geladeira (4°C)	20µL	100µL
Antibiótico (anexo K)	Geladeira (4°C)	50µL	250µL

Adicionar os componentes e o BSA (0,5%) e filtrar em membrana de 0,22µm.

ANEXO B: Meio de Maturação de Oócitos (TCM 199 Bicarbonato)

Solução Mãe TCM 199 Bicarbonato	Localização	10mL	15mL
Água Milli-Q	-	10mL	15mL
TCM 199	Geladeira (4°C)	0,095g	0,142g
Bicarbonato de Sódio (26mM)	Armário	0,022g	0,033g

Obs: Borbulhar gás (95% de N₂ + 5% de CO₂) durante 1min.

Meio de Maturação	Localização	10mL	15mL
Solução Mãe TCM 199 Bicarbonato	-	9mL	13,5mL
SFB / BSA	Freezer / Geladeira	1mL / 50mg	1,5mL / 75mg
Estoque C (Piruvato) (anexo J)	Geladeira (4°C)	20µL	30µL
Antibiótico (anexo K)	Geladeira (4°C)	50µL	75µL
FSH (anexo C)	Freezer (-70°C)	10µL	15µL
LH (anexo D)	Freezer (-70°C)	100µL	150µL

Adicionar os componentes na ordem, filtrar em membrana de 0,22µm e acrescentar o estradiol.

Componente	Localização	10mL	15mL
Estradiol 17β (anexo E)	Freezer (-70°C)	10µL	15µL

Obs.: se for utilizar os meios dos ANEXO A e B na manhã do próximo dia, armazená-los na geladeira (4°C), em tubos vedados com parafilme, e preparar a placa no dia seguinte, 2 horas antes do uso.

ANEXO C: FSH (1mg/mL)

Componentes	Localização	31mL
TCM 199 Bicarbonato (anexo B) ou PBS Completo	Geladeira (4°C)	31mL
Pluset® (500UI = 31,25mg de FSH)	Geladeira (4°C)	500UI

Aliquotar em microtubo de 0,5mL, com 15µL cada, e armazenar em Freezer (-70°C), por até 6m.

ANEXO D: hCG (5mg/mL)

Componentes	Localização	2mL
TCM 199 Bicarbonato (anexo B) ou PBS Completo	Geladeira (4°C)	2mL
Profasi® (2000UI = 0,01g de hCG)	Geladeira (4°C)	2000UI

Aliquotar em microtubo de 0,5mL, com 120µL cada, e armazenar em Freezer (-70°C), por até 6m.

ANEXO E: Estradiol 17b (1mg/mL)

Componentes	Localização	1mL
Etanol Absoluto	Armário	1mL
Estradiol 17β	Geladeira (4°C)	0,001g

Aliquotar em microtubo de 0,5mL, com 15µL cada, e armazenar em Freezer (-70°C), por até 6 meses.

ANEXO F: Solução TL-Stock e TL-Sêmen

Componentes	Localização	TL-Stock	TL-Sêmen	TL-Stock	TL-Sêmen
		25mL		50mL	
Água Milli-Q	-	25mL	25mL	50mL	50mL
NaCl (114mM/100mM)	Armário	0,166g	0,145g	0,333g	0,291g
KCl (3mM/3mM)	Armário	0,006g	0,00575g	0,012g	0,0115g
MgCl ₂ -6H ₂ O (0,5mM/0,4mM)	Dessecador	0,002g	0,002g	0,005g	0,004g
Na ₂ HPO ₄ -Anidro (0,3mM)	Dessecador	0,00117g	0,0010g	0,00235g	0,0020g
Bicarbonato (25mM)	Armário	0,0525g	0,0525g	0,105g	0,105g
CaCl ₂ -2H ₂ O (2mM)	Dessecador	0,0075g	0,0075g	0,015g	0,015g
DL-Ácido Lático (60%)	Geladeira (4°C)	35,7µL	77,5µL	71,5µL	155µL
Phenol Red (30µM)	Geladeira (4°C)	0,0003g	0,0003g	0,0005g	0,0005g
Hepes Ácido (10mM)	Geladeira (4°C)	-	0,0595g	-	0,119g

Ajustar o pH para 7,4 com gás (5% de CO₂) durante 1min. Adicionar os componentes na ordem em que aparecem, filtrar em membrana de 0,22µm e armazenar em geladeira (4°C), por até uma semana.

ANEXO G: Meio TALP-FIV

Componentes	Localização	½ receita (2 touros)	1 receita (4 touros)
TL-Stock (anexo F)	Geladeira (4°C)	3,6mL	7,2mL
Antibiótico (anexo K)	Geladeira (4°C)	20µL	40µL
Estoque C (Piruvato) (anexo J)	Geladeira (4°C)	8µL	16µL
PHE (anexo H)	Freezer (-70°C)	160µL	320µL
Heparina (anexo I)	Geladeira (4°C)	40µL	80µL
BSA (FIV) (6mg/mL)	Geladeira	0,024g	0,048g

Adicionar os componentes, filtrar em membrana de 0,22µm e deixar na estufa úmida de CO₂ com a tampa do frasco frouxa, para equilibrar a temperatura e a atmosfera gasosa.

ANEXO H: PHE

Solução pH 4,0	Localização	50mL
Água Milli-Q	-	50mL
DL-Ácido Lático (60%) (29,4mM)	Geladeira (4°C)	0,165g (pesar o líquido)
Bisulfito de Sódio	Armário	0,050g

Soluções Mãe	Localização	Penicilamina	Hipotaurina	Epinefrina
Salina 0,9%	Geladeira (4°C)	10mL	10mL	-
D-Penicilamina (2mM)	Geladeira (4°C)	0,003g	-	-
Hipotaurina (1mM)	Geladeira (4°C)	-	0,0011g	-
Solução pH 4,0	Fresco	-	-	40mL
Epinefrina (245µM)	Geladeira (4°C)	-	-	0,0018g

PHE final	Localização	11mL
D-Penicilamina	Fresco	2,5mL
Hipotaurina	Fresco	2,5mL
Epinefrina	Fresco	2mL
Salina 0,9%	Geladeira (4°C)	4mL

Aliquotar em 250µL cada, envoltos por papel alumínio, e armazenar em Freezer (-70°C), por até 6m.

ANEXO I: Heparina (176UI)

Componentes	Localização	500mL	1mL
TL-Stock (anexo F)	Geladeira (4°C)	500µL	1mL
Heparina (176UI/mg)	Geladeira (4°C)	0,0015g	0,003g

Armazenar em geladeira (4°C), em microtubo de 1,5mL revestido por papel alumínio, por até um dia.

ANEXO J: Meio SOF

Soluções Estoque	Localização	A Sais	B Bicarbonato	C Piruvato	D CaCl ₂	L- Glutamina
Água Milli-Q	-	9,84mL	10mL	1mL	1mL	1mL
NaCl (1,1M)	Armário	0,629g	-	-	-	-
KCl (72mM)	Armário	0,0534g	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄ (12mM)	Armário	0,0162g	-	-	-	-
MgSO ₄ -7H ₂ O (7,4mM)	Armário	0,0182g	-	-	-	-
DL-Ácido Lático (60%) (50μM)	Geladeira (4° C)	60μL	-	-	-	-
Bicarbonato de Sódio (250mM)	Armário	-	0,210g	-	-	-
<i>Phenol Red</i> (260μM)	Geladeira (4° C)	-	0,001g	-	-	-
Piruvato Sódico (100mM)	Geladeira (4° C)	-		0,011g	-	-
CaCl ₂ -2H ₂ O (178mM)	Dessecador	-	-	-	0,0262g	-
L-Glutamina (200mM)	Geladeira (4° C)	-	-	-	-	0,02923g

Adicionar os componentes na ordem em que aparecem e armazenar em geladeira (4°C). Os estoques A, B, D e L-Glutamina devem ser preparados semanalmente, mas o estoque C, diariamente.

SOF estoque	Localização	10mL	20mL
Água Milli-Q	-	7,8mL	15,6mL
Estoque A	Geladeira (4°C)	1mL	2mL
Estoque B	Geladeira (4°C)	1mL	2mL
Estoque D	Geladeira (4°C)	100μL	200μL
L-Glutamina	Geladeira (4°C)	10μL	20μL
BME Essenciais (50X)	Geladeira (4°C)	100μL	200μL
MEM Não-Essenciais (100X)	Geladeira (4°C)	100μL	200μL
Myo-Inositol (2,8mM)	Geladeira (4°C)	0,005g	0,01g
Tri-Citrato de Sódio Di-Hidratado (340μM)	Armário	0,001g	0,002g

Adicionar os componentes, filtrar em membrana de 0,22μm e armazenar em geladeira (4°C), até 1sem.

Meio SOF final (SOF estoque + 2,5% de SFB ou + 5mg BSA/mL):

SOF final	Localização	1mL	5mL
SOF estoque	Geladeira (4°C)	1mL	5mL
Estoque C	Geladeira (4°C)	2μL	10μL
Antibiótico (anexo K)	Geladeira (4°C)	5μL	25μL
BSA (CIV) / SFB	Geladeira (4°C)	0,005g / 25μL	0,025g / 125μL

Obs: Adicionar o BSA por último, esperar dissolver, filtrar em membrana de 0,22μm e colocar na estufa úmida de CO₂ para equilibrar a temperatura e a atmosfera gasosa.

ANEXO K: Antibiótico

Componentes	Localização	30mL
Água Milli-Q	-	30mL
Sulfato de Amicacina (16,67µg/µL)	Geladeira (4°C)	500mg

Aliquotar em 5mL e armazenar em freezer (-20°C).

Obs: esta solução é utilizada na dose de 50µL/10mL de meio.

ANEXO L: Óleo Mineral ou de Silicone

Esterilizar 200mL de óleo mineral ou de silicone em autoclave, deixar esfriar e adicionar 50mL de solução fisiológica, agitando o frasco para “misturar”, e colocar na estufa úmida de CO₂ para equilibrar a temperatura e a atmosfera gasosa.

ANEXO M: Listagem de Reagentes Utilizados

Produto	nº Catálogo	Fornecedor	Fórmula/Nome
Bicarbonato de Sódio	7412	Mallinckrodt	NaHCO ₃
Bisulfito de Sódio	S-8890	Sigma	SO ₂
BME Essenciais (BME 50x)	11130-051 B-6766/M-7020	Gibco Sigma	-
BSA (CIV)	A-8806	Sigma	Albumina Sérica Bovina (fração V) livre de ácidos graxos e baixa endotoxina
BSA (FIV)	A-6003	Sigma	Albumina Sérica Bovina livre de ácidos graxos essenciais
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.02382.1000	Merck	Cloreto de Cálcio di-hidratado
DL-Ácido Lático (60%)	L-1375	Sigma	C ₃ H ₅ O ₃ Na
DL-Glucose	G-7528	Sigma	C ₆ H ₁₂ O ₆
D-Penicilamida	P-4875	Sigma	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S
Epinefrina	E-4250	Sigma	-
Estradiol 17β	E-2758	Sigma	C ₁₈ H ₂₄ O ₂
Etanol Absoluto	983	Merck	C ₂ H ₅ OH
Glicina	G-6388	Sigma	C ₂ H ₅ NO ₂
Heparina	H-3149	Sigma	-
Heparina Sódica p/ PBS	-	-	-
Hepes Ácido	4018-01	J.T. Baker	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S
Hepes Sódico	H-3784	Sigma	C ₈ H ₁₇ N ₂ O ₄ SNa
Hipotaurina	H-1384	Sigma	C ₂ H ₇ NO ₂ S
KCl	1.04936.1000	Merck	Cloreto de Potássio
KH ₂ PO ₄	4873	Merck	Fosfato de Potássio Monobásico
L-Ácido Aspártico	11016-011 27608	Gibco Riedel-de-Haen	C ₄ H ₇ NO ₄
L-Ácido Glutâmico	G-5889	Sigma	C ₅ H ₈ NO ₄ Na

L-Alanina	A-3534	Sigma	$C_3H_7NO_2$
L-Arginina	A-3784	Sigma	$C_6H_{14}N_4O_2$
L-Asparagina	A-4284	Sigma	$C_4H_8N_2O_3-H_2O$
L-Cistina	C-8786	Sigma	$C_6H_{12}N_2O_4S_2$
L-Fenilalanina	P-5030	Sigma	$C_9H_{11}NO_2$
L-Glutamina	G-5763	Sigma	$C_5H_{10}N_2O_3$
L-Histidina (Free Base)	H-9386	Sigma	$C_6H_9N_3O_2$
L-Isoleucina	I-7383	Sigma	$C_6H_{13}NO_2$
L-Leucina	L-2884	Sigma	$C_6H_{13}NO_2$
L-Lisina	L-1137	Sigma	$C_6H_{14}N_2O_2$
L-Metionina	M-2893	Sigma	$C_5H_{11}NO_2S$
L-Prolina	P-4655	Sigma	$C_5H_9NO_2$
L-Serina	S-5511	Sigma	$C_3H_7NO_3$
L-Tirosina	T-1020	Sigma	$C_9H_{11}NO_3$
L-Treonina	T-1645	Sigma	$C_4H_9NO_3$
L-Triptofano	T-0271	Sigma	$C_{11}H_{12}N_2O_2$
L-Valina	V-6501	Sigma	$C_5H_{11}NO_2$
MEM não Essenciais (MEM 100x)	11140-050 M-7145	Gibco Sigma	-
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1.05833-1000	Merck	Cloreto de Magnésio hexa-hidratado
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5886	Merck	Sulfato de Magnésio
Myo-Inositol	I-7508	Sigma	-
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	6579	Merck	Fosfato dissódico 12-hidrato
Na_2HPO_4 -Anidro	3170	Casa da Química Ltda	Fosfato de Sódio bibásico anidro
NaCl	3624-19	J.T. Baker	Cloreto de Sódio, cristal
Óleo Mineral ou de Silicone	M-3516 200 Fluid 50CST	Sigma Dow Corning	Polidimetil-siloxino
<i>Phenol Red</i> (Sal Sódico)	P-5530	Sigma	$C_{19}H_{13}O_5SNa$
Piruvato Sódico	44094	Biochemical	$CH_3.CO.COONa$
Pluset [®] (FSH)	-	Calier	-
Profasi [®] (hCG)	-	-	-
SFB	-	Matadouro	-
Sulfato de Amicacina	-	Biochimico	-
TCM-199	31.100-027	Gibco BRL Life Technologies [™]	Medium 199
Tri-Citrato de Sódio Di-Hidratado	1.06448.1000	Merck	$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$