

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

**ESTRATÉGIAS PARA MINIMIZAÇÃO DO ESTRESSE
OXIDATIVO EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO IN VITRO DE
EMBRIÕES BOVINOS DESTINADOS À VITRIFICAÇÃO**

Nathália Alves de Souza Rocha Frigoni

Médica Veterinária

2016

**T
E
S
E**

/

**R
O
C
H
A
-
F
R
I
G
O
N
I**

**N.
A.
S.**

**2
0
1
6**

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

**ESTRATÉGIAS PARA MINIMIZAÇÃO DO ESTRESSE
OXIDATIVO EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO IN VITRO DE
EMBRIÕES BOVINOS DESTINADOS À VITRIFICAÇÃO**

Nathália Alves de Souza Rocha Frigoni

Médica Veterinária

2016

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

**ESTRATÉGIAS PARA MINIMIZAÇÃO DO ESTRESSE
OXIDATIVO EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO IN VITRO DE
EMBRIÕES BOVINOS DESTINADOS À VITRIFICAÇÃO**

**Nathália Alves de Souza Rocha Frigoni
Orientadora: Profa. Adj. Gisele Zoccal Mingoti**

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

2016

R672e Rocha-Frigoni, Nathália Alves de Souza
Estratégias para minimização do estresse oxidativo em sistemas de produção *in vitro* de embriões bovinos destinados à vitrificação / Nathália Alves de Souza Rocha-Frigoni. – – Jaboticabal, 2016
viii, 101 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientadora: Gisele Zoccal Mingoti
Banca examinadora: Felipe Perecin, Marcelo Fábio Gouveia Nogueira, Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima, Marcos Antonio Rossi Feliciano
Bibliografia

1. Antioxidantes. 2. Apoptose. 3. Espécies reativas de oxigênio. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.2

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ESTRATÉGIAS PARA MINIMIZAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS DESTINADOS À VITRIFICAÇÃO.

AUTORA: NATHALIA ALVES DE SOUZA ROCHA FRIGONI

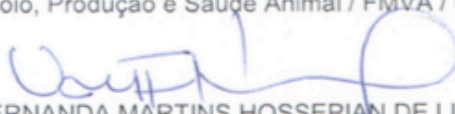
ORIENTADORA: GISELE ZOCCAL MINGOTI

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



Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / FMVA / UNESP - Araçatuba/SP



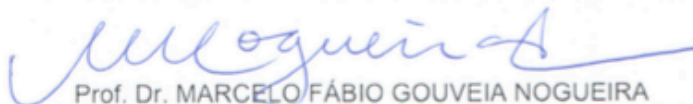
Profa. Dra. VERA FERNANDA MARTINS HOSSEPIAN DE LIMA

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. MARCUS ANTONIO ROSSI FELICIANO

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. MARCELO FÁBIO GOUVEIA NOGUEIRA

Departamento de Ciências Biológicas / FCL / UNESP - Assis/SP



Prof. Dr. FELIPE PERECIN

FZEA/USP - Pirassununga/SP

Jaboticabal, 03 de fevereiro de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Nathália Alves de Souza Rocha Frigoni – nascida em Ribeirão Preto-SP, aos 7 dias do mês de Novembro de 1985. Concluiu o ensino médio no Colégio Oswaldo Cruz (COC), na cidade de Ribeirão Preto-SP, em dezembro de 2003. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho – UNESP Campus Jaboticabal-SP, em março de 2005. Concluiu o ensino superior em Medicina Veterinária em dezembro de 2009. Ingressou no curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, nível de Mestrado e área de concentração de Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Campus de Jaboticabal-SP, em março de 2010, sob orientação da Profa. Adj. Gisele Zoccal Mingoti, com bolsa de mestrado da CNPq. Ingressou no curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, nível de Doutorado e área de concentração de Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Campus de Jaboticabal-SP, em março de 2012, sob orientação da Profa. Adj. Gisele Zoccal Mingoti, com bolsa de mestrado da FAPESP.

EPÍGRAFE

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.”

Martin Luther King

DEDICO

Aos meus pais,

Márcio e Beatriz

À minha querida irmã Fernanda

À minha avó Vera Alice (*in memoriam*)

Pelo apoio e amor incondicional.

Ao meu amor Fabio,

Pela compreensão e companheirismo em todos
os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me fortalece e me mostra os caminhos a seguir.

À Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti, pela orientação, amizade, confiança e ensinamentos.

Às minhas amigas e companheiras do laboratório, Beatriz Leão, Priscila Chediek Dall'Acqua e Marcela Ambrogi pela amizade, companheirismo e ensinamentos durante esses anos.

Ao técnico do laboratório, Alexandre Teixeira, pelo auxílio necessário para a realização do experimento e funcionamento do laboratório.

Ao funcionário Adão Custódio por providenciar o material necessário para a realização do experimento.

Às estagiárias que acompanharam e ajudaram na execução do experimento: Luana Rodrigues, Giovana Barros Nunes, Juliana Viegas, Maria Isabela Azeredo.

Aos professores componentes da banca examinadora Prof. Dr. Felipe Perecin, Prof. Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira, Prof. Dr. Marcus Antonio Rossi Feliciano e Profa. Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima pelos ensinamentos e contribuições na defesa.

Ao Prof. Dr. Peter James Hansen pela oportunidade de realizar estágio de pesquisa no Laboratório de Produção *in vitro* na Universidade da Flórida, Gainesville, EUA e à toda sua equipe.

À minha família e toda família Frigoni por todo amor e incentivo.

À FAPESP pela bolsa de estudos.

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

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

À toda equipe do Laboratório de Fisiologia da Reprodução (#labfisiorep) que contribuiu de alguma forma para esse trabalho.

A todos, que de alguma forma, contribuíram com incentivo, apoio e confiança para que esse trabalho se tornasse realidade e concluísse a realização de um sonho.

APOIO FINANCEIRO

Este projeto teve bolsa de estudo concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, sob o processo nº 2012/10083-8.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
Introdução.....	1
Objetivo	3
Hipótese	3
Revisão de Literatura.....	3
Espécies reativas de oxigênio, sua relação com o estresse oxidativo e seus efeitos na produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	3
Efeito da adição de antioxidantes nos meios de cultivo <i>in vitro</i>	5
Fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) e seu papel biológico em oócitos e embriões bovinos.....	8
Apoptose.....	9
Criopreservação e criotolerância de embriões PIV.....	10
Referências.....	13
CAPÍTULO 2 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTES DURANTE A MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> SOBRE A QUALIDADE E AQUISIÇÃO DE COMPETÊNCIA OOCITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO.....	20
Resumo.....	20
Introdução.....	21
Material e Métodos.....	24
Reagentes químicos.....	24
Obtenção de oócitos e maturação <i>in vitro</i>	24
Separação espermática e fertilização <i>in vitro</i>	25
Cultivo embrionário <i>in vitro</i>	25

Determinação da taxa de apoptose e avaliação da maturação nuclear.....	26
Mensuração do conteúdo intracelular de GSH reduzida.....	27
Mensuração do conteúdo intracelular de ROS pelo ensaio com diclorofluoresceína.....	27
Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	28
Análise estatística.....	30
Resultados.....	30
Discussão.....	34
Conclusão.....	40
Referências.....	41

CAPÍTULO 3 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTE DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* SOBRE A QUALIDADE E DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS EM CONDIÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO.....

Resumo.....	47
Introdução.....	48
Material e Métodos.....	51
Reagentes químicos.....	51
Obtenção de oócitos e maturação <i>in vitro</i>	51
Separação espermática e fertilização <i>in vitro</i>	52
Cultivo embrionário <i>in vitro</i>	52
Mensuração do conteúdo intracelular de GSH reduzida.....	53
Mensuração do conteúdo intracelular de ROS pelo ensaio com diclorofluoresceína.....	53
Mensuração da atividade das caspases 3 e 7.....	54
Deteção de fragmentação nuclear (coloração “terminal transferase assay”-TUNEL).....	54
Delineamento experimental.....	57
Análise estatística.....	57
Resultados.....	58
Discussão.....	61
Conclusão.....	66

Referências.....	67
------------------	----

CAPÍTULO 4 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM IGF-1 DURANTE O CULTIVO *IN VITRO* SOBRE A QUALIDADE E DESENVOLVIMENTO DE MEBRIÕES BOVINOS EM CONDIÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO.....71

Resumo.....	71
Introdução.....	73
Material e Métodos.....	75
Reagentes químicos.....	75
Obtenção de oócitos e maturação <i>in vitro</i>	76
Separação espermática e fertilização <i>in vitro</i>	76
Cultivo embrionário <i>in vitro</i>	77
Mensuração do conteúdo intracelular de GSH reduzida.....	77
Mensuração do conteúdo intracelular de ROS pelo ensaio com diclorofluoresceína.....	78
Mensuração da atividade das caspases 3 e 7.....	78
Detecção de fragmentação nuclear (coloração “terminal transferase assay”-TUNEL).....	79
Vitrificação e aquecimento dos embriões.....	80
Extração do RNA total e reação de transcrição reversa.....	80
Expressão gênica por qPCR.....	81
Delineamento experimental.....	83
Análise estatística.....	83
Resultados.....	84
Discussão.....	89
Conclusão.....	95
Referências.....	96

CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....101

ESTRATÉGIAS PARA MINIMIZAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS DESTINADOS À VITRIFICAÇÃO

RESUMO – O objetivo desse estudo foi avaliar diferentes estratégias para minimizar os efeitos do estresse oxidativo induzido pela menadiona durante o cultivo *in vitro* sobre o potencial de desenvolvimento embrionário *in vitro*. Para tanto, no Experimento I, os oócitos foram MIV em meio suplementado com 0,6 mM de cisteína e 100 μ M de cisteamina (C+C), 100 UI de catalase (CAT), 0,6 mM de cisteína associado à 100 μ M de cisteamina e 100 UI de catalase (C+C+CAT), ou sem a suplementação com antioxidantes (Controle). Posteriormente, foram fecundados e os prováveis zigotos cultivados *in vitro* durante 7 dias. Oócitos imaturos (0h) e após 22 h de MIV foram avaliados quanto ao conteúdo intracelular de ROS e de GSH, potencial de membrana mitocondrial, maturação nuclear e ocorrência de apoptose. No Experimento II, oócitos foram MIV em meio suplementado com C+C+CAT (ATX) e os prováveis zigotos foram CIV em meio SOF. Do Dia 6 até o final do CIV os embriões foram cultivados na presença ou ausência de 5 μ M de menadiona (MD). No dia 7 foi avaliada a taxa de blastocistos e os mesmos destinados às avaliações quanto ao conteúdo intracelular de ROS e GSH, atividade de caspases 3 e 7 e ocorrência de apoptose. Por fim, no Experimento III, oócitos foram MIV e os prováveis zigotos foram CIV em meio SOF suplementado com 100 ng/mL de IGF-I (IGF). Do Dia 6 até o final do CIV os embriões foram cultivados na presença ou ausência de 5 μ M de menadiona (MD). No dia 7 foi avaliada a taxa de blastocistos e os mesmos foram destinados às avaliações previamente descritas no Experimento II além da avaliação da taxa de re-expansão após vitrificação/aquecimento e expressão dos genes CASP3, GPX-1 e SOD-1. No experimento I, a taxa de maturação nuclear não foi afetada pelos tratamentos ($P > 0,05$). A porcentagem de apoptose do grupo C+C+CAT foi superior ($P < 0,05$) ao grupo CAT, porém os grupos Controle e C+C não diferiram dos demais ($P > 0,05$). O conteúdo intracelular de ROS nos grupos C+C e C+C+CAT foi semelhante ao observado em oócitos imaturos (0h), e o maior ($P < 0,05$) nível de ROS foi encontrado no grupo Controle. O conteúdo intracelular de GSH foi reduzido ($P < 0,05$) em todos os grupos quando comparados aos oócitos imaturos, no entanto os grupos Controle, CAT e C+C+CAT apresentaram menores ($P < 0,05$) concentrações de GSH quando comparado ao grupo C+C. O potencial de membrana mitocondrial aumentou em todos os grupos ($P < 0,05$) comparado com os oócitos imaturos (0h), com exceção do grupo C+C. A taxa de blastocistos foi maior ($P < 0,05$) no grupo C+C+CAT comparada aos demais grupos. No experimento II, o conteúdo intracelular de GSH foi similar ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais. O conteúdo intracelular de ROS encontrado no grupo MD foi superior ($P < 0,05$) aos observados nos grupos Controle e Controle ATX, já o grupo ATX MD não diferiu ($P > 0,05$) dos grupos anteriormente mencionados. A atividade de caspases não diferiu ($P > 0,05$) entre os grupos. No entanto, as porcentagens de apoptose encontradas nos grupos MD e ATX MD foram superiores ($P < 0,05$) comparadas aos grupos Controle e Controle ATX. A taxa de blastocisto foi menor ($P < 0,05$) no grupo MD comparados aos grupos Controle e Controle ATX, porém o grupo ATX MD não diferiu ($P > 0,05$) dos demais grupos experimentais. No experimento III, o conteúdo intracelular de GSH foi similar ($P > 0,05$) entre os grupos

experimentais. O conteúdo intracelular de ROS encontrado no grupo MD foi superior ($P<0,05$) ao observado no grupo Controle, já os grupos IGF e IGF MD não diferiram ($P>0,05$) dos grupos anteriormente mencionados. Com relação à atividade de caspases 3 e 7 não houve diferença ($P>0,05$) entre os grupos. O número total de blastômeros não diferiu ($P>0,05$) entre os grupos experimentais. No entanto, as maiores porcentagens de apoptose foram encontradas no grupo MD e foram superiores ($P<0,05$) aos grupos Controle, IGF e IGF MD. Níveis intermediários de porcentagem de apoptose foram encontrados nos grupos Controle e IGF MD, que não diferiram entre si ($P>0,05$), porém tais grupos foram superiores ($P<0,05$) comparado ao grupo IGF, que apresentou as menores porcentagens ($P<0,05$). A taxa de blastocisto foi menor ($P<0,05$) no grupo MD comparados aos grupos Controle e IGF, porém o grupo IGF MD não diferiu ($P>0,05$) dos demais grupos experimentais. A taxa de re-expansão foi inferior ($P<0,05$) no grupo MD comparada aos grupos Controle e IGF, que não diferiram entre si ($P>0,05$). O grupo IGF MD não diferiu ($P>0,05$) dos grupos IGF e MD, porém foi inferior ($P<0,05$) quando comparado ao grupo Controle. Não houve diferença ($P>0,05$) na expressão relativa dos genes CASP3 e GPX-1 entre os grupos experimentais. No entanto, a expressão do gene SOD-1 foi maior ($P<0,05$) no grupo IGF MD comparado ao grupo IGF, porém estes grupos não diferiram ($P>0,05$) dos grupos Controle e MD. Em conclusão, a suplementação com antioxidantes intra- e extracelulares durante a MIV melhorou a competência oocitária para o desenvolvimento embrionário e minimizou os efeitos deletérios do estresse oxidativo induzido pela menadiona. Ainda, a adição de IGF-1 durante o CIV aumentou a resistência ao estresse oxidativo induzido pela menadiona, visto que aumentou a expressão do gene antioxidante SOD-1, o que resultou em redução da apoptose e melhorou o desenvolvimento e criotolerância de blastocistos bovinos.

Palavras-chave: antioxidantes, apoptose, espécies reativas de oxigênio

STRATEGIES FOR MINIMIZING OXIDATIVE STRESS IN IN VITRO PRODUCTION SYSTEM OF BOVINE EMBRYOS DESTINED FOR VITRIFICATION

ABSTRACT - The study aimed to evaluate different strategies to minimize the effects of oxidative stress induced by menadione during *in vitro* culture on the potential for *in vitro* embryonic development. Therefore, in Experiment I, the oocytes were IVM in medium supplemented with 0.6 mM cysteine and 100 mM cysteamine (C+C), 100 IU catalase (CAT), 0.6 mM cysteine associated with 100 uM cysteamine and 100 IU catalase (C+C+CAT) or without antioxidants supplementation (Control). Then, were fertilized and the presumptive zygotes were *in vitro* cultured for 7 days. Immature oocytes (0h) and oocytes after 22 h of IVM were evaluated for intracellular levels of GSH and ROS, mitochondrial membrane potential, nuclear maturation and apoptosis. In Experiment II, oocytes were IVM in medium supplemented with C+C+CAT (ATX) and the presumptive zygotes were IVC in SOF medium. From Day 6 to the end of the IVC, embryos were cultured in the presence or absence of 5 uM menadione (MD). On day 7, embryo development to the blastocyst rate was evaluated. Blastocysts were subjected to evaluations for intracellular GSH and ROS content, caspases 3 and 7 activity and apoptosis. Finally, Experiment III, oocytes were IVM and the presumptive zygotes were IVC in SOF medium supplemented with 100 ng/mL IGF-I (IGF). From Day 6 to the end of the IVC, embryos were cultured in the presence or absence of 5 uM menadione (MD). On day 7, embryo development to the blastocyst rate was evaluated. Blastocysts were subjected to evaluations for intracellular GSH and ROS content, caspases 3 and 7 activity, apoptosis, re-expansion rates after vitrification/thawing and expression of CASP3, GPX-1 and SOD-1 genes. In the first experiment, nuclear maturation rate was not affected by treatments ($P>0.05$). The percentage of apoptosis in C+C+CAT group was higher ($P<0.05$) compared to CAT group, but the Control and C+C groups did not differ from other groups ($P>0.05$). Intracellular ROS levels in C+C and C+C+CAT groups were similar to that observed in immature oocytes (0h) and higher ($P<0.05$) ROS levels were found in Control group. The intracellular GSH stocks was reduced ($P<0.05$) in all groups compared to immature oocytes, however the Control, CAT and C+C+CAT groups had lower ($P<0.05$) GSH concentrations compared to C+C group. The mitochondrial membrane potential was increased in all groups ($P<0.05$) when compared to immature oocytes (0h), with the only exception of C+C group. The blastocyst rate was higher ($P<0.05$) in the C+C+CAT group compared to the other groups. In the second experiment, the intracellular GSH levels was similar ($P>0.05$) between the experimental groups. The intracellular ROS levels found in the MD group was higher ($P<0.05$) than Control and Control ATX groups, ATX MD group did not differ ($P>0.05$) from the groups mentioned above. The caspases 3 and 7 activity did not differ ($P>0.05$) between groups. However, the percentage of apoptosis found in MD and MD ATX groups were higher ($P<0.05$) compared to Control and Control ATX groups. The blastocyst rate was lower ($P<0.05$) in the MD group compared to Control and Control ATX groups, but the ATX MD group did not differ ($P>0.05$) from the other experimental groups. In Experiment III, the intracellular GSH levels was similar ($P>0.05$) between the experimental groups. The intracellular ROS levels found in the MD group was higher ($P<0.05$) than observed in the Control group,

however IGF and IGF MD groups did not differ ($P>0.05$) from the groups mentioned above. Caspases 3 and 7 activity and the total number of blastomeres did not differ ($P>0.05$) between experimental groups. However, the highest apoptotic percentages were found in the MD group and were higher ($P<0.05$) than Control, IGF and IGF MD groups. Intermediate apoptosis percentage levels were found in Control and IGF MD groups, which did not differ ($P>0.05$), but these groups were higher ($P<0.05$) compared to IGF group, which had the lowest percentages ($P<0.05$). The blastocyst rate was lower ($P<0.05$) in the MD group compared to Control and IGF groups, but IGF MD group did not differ ($P>0.05$) from the other experimental groups. The re-expansion rates was lower ($P<0.05$) in the MD group compared to Control and IGF groups, which did not differ ($P>0.05$). The IGF MD group did not differ ($P>0.05$) of the IGF and MD groups, but was lower ($P<0.05$) when compared to the Control group. There was no difference ($P>0.05$) in the relative expression of CASP3 and GPX-1 genes between experimental groups. However, expression of the SOD-1 gene was higher ($P<0.05$) in the IGF MD compared to IGF group, however these groups did not differ ($P>0.05$) from Control and MD groups. In conclusion, supplementation with intra- and extracellular antioxidants during IVM improved oocyte competence for embryonic development and minimized the deleterious effects of oxidative stress induced by menadione. Furthermore, the addition of IGF-1 for the IVC increased resistance to oxidative stress induced by menadione, whereas increased the expression of the antioxidant gene SOD-1, which resulted in reduction of apoptosis and improvement of blastocyst development and cryotolerance.

Keywords: antioxidants, apoptosis, reactive oxygen species

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 2 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTES DURANTE A MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> SOBRE A QUALIDADE E AQUISIÇÃO DE COMPETÊNCIA OOCITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	
Tabela 1 - Fase da maturação nuclear e ocorrência de apoptose em oócitos bovinos MIV em meio suplementado com diferentes antioxidante.....	31
CAPÍTULO 3 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTE DURANTE A MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> SOBRE A QUALIDADE E DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS EM CONDIÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO	
Tabela 1 - Número total de células e porcentagem de apoptose em embriões produzidos <i>in vitro</i> e submetidos ao estresse oxidativo e oriundos de oócitos maturados <i>in vitro</i> na presença de antioxidantes.....	60
CAPÍTULO 4 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM IGF-1 DURANTE A MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> SOBRE A QUALIDADE E DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS EM CONDIÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO	
Tabela 1 - Número total de células e porcentagem de apoptose em embriões produzidos <i>in vitro</i> e submetidos ao estresse oxidativo e oriundos de oócitos maturados <i>in vitro</i> na presença de antioxidantes.....	87

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO 2 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTES DURANTE A MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> SOBRE A QUALIDADE E AQUISIÇÃO DE COMPETÊNCIA OOCITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	
Figura 1 - Imagem ilustrativa de oócitos bovinos corados com a sonda fluorescente ThiolTracker Violet para detecção da glutathione (GSH) intracelular (A); com a sonda fluorescente H ₂ DCFDA para detecção das espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelulares (B); com a sonda fluorescente MitoTracker Red para avaliação do potencial de membrana mitocondrial (C); com a sonda fluorescente Hoechst 33342 para a identificação do material nuclear (em azul, D); e ensaio TUNEL para a determinação da fragmentação nuclear (em verde, E). Os oócitos foram avaliados em microscopia de epifluorescência (ver no texto o detalhamento dos filtros utilizados para cada sonda). Aumento 20 X.....	29
Figura 2 - Concentrações intracelulares de GSH (quantificados em unidades arbitrárias de fluorescência) em oócitos maturados <i>in vitro</i> em meio suplementado ou não com antioxidantes.....	31
Figura 3 - Concentrações intracelulares de ROS (quantificados em unidades arbitrárias de fluorescência) em oócitos maturados <i>in vitro</i> em meio suplementado ou não com antioxidantes.....	32
Figura 4 - Potencial de membrana mitocondrial (quantificado em unidades arbitrárias de fluorescência) de oócitos maturados <i>in vitro</i> em meio suplementado ou não com antioxidantes.....	33
Figura 5 - Efeito da suplementação com diferentes antioxidantes durante a maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos sobre as taxas de clivagem e desenvolvimento até a fase de blastocistos.....	34
CAPÍTULO 3 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTE DURANTE A MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> SOBRE A QUALIDADE E DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS EM CONDIÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO	

Figura 1 - Imagem ilustrativa de embriões bovinos corados com a sonda fluorescente Hoechst 33342 para a identificação dos núcleos e contagem do número total de blastômeros (em azul, A); ensaio TUNEL para detecção das células em apoptose (em verde, B); sobreposição das imagens (C); embriões corados com a sonda fluorescente ThiolTracker Violet para detecção da glutathione (GSH) intracelular (D); embriões corados com a sonda fluorescente H₂DCFDA para detecção das espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelulares (E); e embriões corados com a sonda fluorescente FLICA para mensuração da atividade de caspases 3 e 7 (F). Os embriões foram avaliados em microscopia de epifluorescência (ver no texto o detalhamento dos filtros utilizados para cada sonda). Aumento 20 X.....56

Figura 2 - Concentrações intracelulares de GSH (quantificados em unidades arbitrárias de fluorescência) em embriões produzidos *in vitro* na presença ou ausência de menadiona e oriundos de oócitos maturados *in vitro* com antioxidantes.....58

Figura 3 - Concentrações intracelulares de ROS (quantificados em unidades arbitrárias de fluorescência) em embriões produzidos *in vitro* na presença ou ausência de menadiona e oriundos de oócitos maturados *in vitro* com antioxidantes.....59

Figura 4 - Atividade das caspases 3 e 7 (quantificados em unidades arbitrárias de fluorescência) em embriões produzidos *in vitro* na presença ou ausência de menadiona e oriundos de oócitos maturados *in vitro* com antioxidantes.....60

Figura 5 - Taxa de clivagem e blastocistos obtidas à partir de oócitos maturados *in vitro* na presença ou não de antioxidante e dos embriões cultivados *in vitro* na presença ou ausência de menadiona (MD).....61

CAPÍTULO 4 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM IGF-1 DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* SOBRE A QUALIDADE E DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS EM CONDIÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO

Figura 1 - Concentrações intracelulares de GSH (quantificados em unidades arbitrárias de fluorescência) em embriões produzidos *in vitro* em meio suplementado ou não com IGF-1 e na presença ou ausência de menadiona.....84

Figura 2 - Concentrações intracelulares de ROS (quantificados em unidades arbitrárias de fluorescência) em embriões produzidos <i>in vitro</i> em meio suplementado ou não com IGF-1 e na presença ou ausência de menadiona.....	85
Figura 3 - Atividade das caspases 3 e 7 (quantificados em unidades arbitrárias de fluorescência) em embriões produzidos <i>in vitro</i> em meio suplementado ou não com IGF-1 e na presença ou ausência de menadiona.....	86
Figura 4 - Taxa de clivagem e blastocistos obtidas de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> em meio suplementado ou não com IGF-1 e na presença ou ausência de menadiona.....	87
Figura 5 - Taxa de re-expansão após 24 h de recultivo de blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i> em meio suplementado ou não com IGF-1 e na presença ou ausência de menadiona.....	88
Figura 6 - Expressão relativa dos genes caspase 3 (CASP3), glutathione peroxidase 1 (GPX-1) e superóxido dismutase 1 (SOD-1) em blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i> em meio suplementado ou não com IGF-1 e na presença ou ausência de menadiona.....	89

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

A biotécnica de produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos é amplamente empregada, com finalidades de pesquisa e comercial, porém tais embriões apresentam pior qualidade e competência de desenvolvimento em comparação com os obtidos *in vivo*. Ainda, embriões PIV são mais sensíveis às baixas temperaturas e possuem criotolerância inferior quando comparados a embriões produzidos *in vivo* (IMAI *et al.*, 2002). Isso ocorre devido ao aumento na concentração lipídica de embriões durante o cultivo *in vitro* (CIV), em decorrência da inclusão de certos componentes no meio de cultivo como, por exemplo, o soro fetal. O acúmulo de lipídeos e consequente aumento da peroxidação lipídica causada por espécies reativas de oxigênio (ROS) são, em grande parte, responsáveis por, prejudicar o desenvolvimento e criotolerância de embriões PIV (NEDAMBALE *et al.*, 2006).

O estresse oxidativo é resultado do desequilíbrio entre a produção de ROS e os mecanismos celulares antioxidantes (FEUGANG *et al.*, 2003) e pode acarretar diferentes tipos de injúrias celulares, tais como peroxidação lipídica, oxidação de aminoácidos e ácidos nucléicos, bem como apoptose. Estes fatores em conjunto podem diminuir a viabilidade embrionária (KITAGAWA *et al.*, 2004), especialmente em embriões PIV que são mais susceptíveis aos danos oxidativos, visto que seus mecanismos de defesa são insuficientes para proteger sua delicada estrutura celular (GOTO *et al.*, 1993).

Para evitar danos induzidos pelo estresse oxidativo no embrião, vários antioxidantes podem ser adicionados aos meios de cultivo *in vitro* para melhorar o desenvolvimento com sucesso variável (ALI *et al.*, 2003). Compostos tiol de baixo peso molecular, como β -mercaptoetanol, cisteína, cistina e cisteamina, são usados como suplementos do meio de maturação de oócitos (DE MATOS *et al.*, 1997; ALI *et al.*, 2003) e de cultivo embrionário (CAAMAÑO *et al.*, 1996; LIM *et al.*, 1996; TAKAHASHI *et al.*, 1993). Estes compostos servem como precursores da síntese de

glutathiona (GSH), a qual atua na manutenção do estado redução-oxidação (redox) nas células, protegendo-as contra os danos oxidativos (DELEUZE & GOUDET, 2010) ao promover a detoxificação de peróxidos lipídicos e de proteínas tioladas, bem como a remoção de H_2O_2 em embriões (JOHNSON & NARS-ESFAHANI, 1994). Portanto, o aumento da síntese de GSH durante a maturação pode ser correlacionado com a competência do oócito para o posterior desenvolvimento embrionário inicial e viabilidade pós-criopreservação (FURNUS *et al.*, 2008).

Além da ação protetora de antioxidantes sobre as células em cultivo, uma outra estratégia é a suplementação dos meios de cultivo *in vitro* com antioxidantes enzimáticos extracelulares, como a superóxido dismutase (SOD) ou catalase (ALI *et al.*, 2003), visando a modulação das ROS extracelulares. Embora haja poucos estudos demonstrando os efeitos protetores destes antioxidantes em sistemas de PIV, foi recentemente demonstrado (ROCHA-FRIGONI *et al.*, 2014) que a adição de catalase promoveu redução dos níveis intracelulares de ROS e da taxa de apoptose de embriões bovinos PIV. Desta forma, está claro que a proteção dos embriões PIV contra o estresse oxidativo resulta em aumento nas taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro*, bem como na qualidade dos embriões obtidos. Todavia, ainda não está bem estabelecido se estes benefícios acarretam em maior criotolerância de tais embriões.

Além dos antioxidantes, outros fatores já demonstraram desempenhar importante papel no desenvolvimento embrionário em condições adversas, como por exemplo, fatores de crescimento. Diversos relatos indicam que o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I) atua como um fator de sobrevivência ao reduzir os efeitos deletérios sobre o desenvolvimento e viabilidade embrionária quando blastocistos são submetidos a condições adversas, como estresse oxidativo (MOSS *et al.*, 2009; KURZAVA *et al.*, 2002). O IGF-I exerce efeito positivo sobre o desenvolvimento pré-implantacional por estimular o metabolismo e crescimento embrionário, via redução da apoptose e aumento do número total de blastômeros (LOTT *et al.*, 2010).

Está bem elucidado que a proteção dos embriões PIV contra o estresse oxidativo é uma das chaves para o aprimoramento do desenvolvimento embrionário *in vitro* (TAKAHASHI *et al.*, 2012). Desta forma, este estudo tem como principal

objetivo avaliar os efeitos da suplementação com antioxidantes e IGF-I, nas diferentes etapas da PIV, sobre o desenvolvimento, qualidade e criotolerância de embriões bovinos.

2. OBJETIVO

Avaliar o efeitos de antioxidantes e de IGF-1, utilizados em etapas da produção *in vitro*, sobre a competência no desenvolvimento, qualidade e criotolerância de embriões bovinos submetidos ao estresse oxidativo induzido pela menadiona.

3. HIPÓTESE

A suplementação com antioxidantes durante a MIV de oócitos bovinos e com IGF-1 no meio de cultivo *in vitro* exerce efeito benéfico sobre a competência oocitária e melhora a qualidade, desenvolvimento e criotolerância embrionária *in vitro* sob condições de estresse oxidativo induzido.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Espécies reativas de oxigênio, sua relação com o estresse oxidativo e seus efeitos na produção *in vitro* de embriões bovinos

As ROS são formadas durante as etapas intermediárias da redução da molécula de oxigênio e incluem o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), os quais correspondem à redução de um, dois e três elétrons, respectivamente. Ainda, o radical hidroperóxido ($HO_2^{\cdot}$), um ácido conjugado do radical superóxido, desempenha um papel fundamental na ativação da cascata da peroxidação lipídica nas membranas celulares (GUÉRIN *et al.*, 2001).

As ROS são produzidas por oócitos, embriões e pelas células do *cumulus oophorus* (GUÉRIN *et al.*, 2001) durante o metabolismo aeróbico, mais

especificamente pela fosforilação oxidativa nas mitocôndrias (FEUGANG *et al.*, 2003). São extremamente reativas e instáveis, podendo interagir com diversas moléculas para adquirirem elétrons e, conseqüentemente, tornarem-se estáveis (DELEUZE & GOUDET, 2010). Essas interações, por sua vez, induzem uma cascata de reações em cadeia que eventualmente podem levar a danos celulares (PIERCE *et al.*, 2004), incluindo peroxidação lipídica (fosfolipídeos de membrana), oxidação de aminoácidos e ácidos nucleicos, e apoptose que podem, subsequentemente, diminuir a viabilidade da PIV de embriões (KITAGAWA *et al.*, 2004). Mais especificamente, elevados níveis de ROS promovem ativação da via intrínseca da apoptose com conseqüente ruptura das membranas mitocondriais, liberação do citocromo C e ativação da cascata de caspases (TVRDÁ *et al.*, 2011). Por outro lado, apesar do aumento dos níveis intracelulares das ROS desencadear as ações nocivas descritas, estas também atuam como moléculas sinalizadoras em diversas reações celulares e sua redução excessiva pode acarretar em parada do desenvolvimento embrionário (UFER *et al.*, 2010). Portanto, a produção de ROS e os mecanismos antioxidantes devem estar em constante equilíbrio, visto que funções fisiológicas relacionadas à reprodução podem ser comprometidas, tanto na presença de excesso como na diminuição extrema de suas concentrações.

As condições de incubação adotadas nos sistemas de PIV podem gerar estresse oxidativo ou um desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes (NABENISHI *et al.*, 2011), culminando com bloqueio do desenvolvimento embrionário *in vitro* (FUKUI & OYAMADA, 2004). A produção de ROS varia de acordo com o estágio de desenvolvimento embrionário. Em ratos, por exemplo, o aumento da produção de ROS ocorre no momento da fecundação e transição G2/M do segundo ciclo celular, o que pode ser relacionado com o bloqueio do desenvolvimento embrionário *in vitro* (NARS-ESFAHANI & JOHNSON, 1991). Diversos fatores exógenos podem alterar a produção de ROS nos sistemas de PIV de embriões de mamíferos, como a elevada tensão de oxigênio durante o CIV, presença de cátions metálicos na água e/ou reagentes utilizados, exposição à luz visível, produção de ROS pelos espermatozoides durante a FIV, excesso de glicose e o processo de criopreservação/aquecimento (GUÉRIN *et al.*, 2001).

Dada a constante ameaça à viabilidade celular imposta pela ação das ROS, vários estudos tem focado a atenção na utilização de substâncias antioxidantes em sistemas de PIV. A utilização de compostos que induzam um aumento expressivo na produção de ROS, como a menadiona, pode ser uma ferramenta interessante no estudo sistematizado dos danos deletérios decorrentes do estresse oxidativo. A menadiona, ou vitamina k_3 , é uma naftoquinona utilizada como fonte de vitaminas na nutrição animal (MOSS *et al.*, 2009). Na presença de oxigênio, induz a geração de O_2^- , H_2O_2 e outras ROS (MONKS *et al.*, 1992), resultando em apoptose (MOSS *et al.*, 2009). Desta forma, a utilização da menadiona como geradora de estresse oxidativo em sistemas de PIV pode ser um modelo interessante para a avaliação do efeito protetor ou promotor de sobrevivência de drogas específicas, tais como antioxidantes extra ou intracelulares e fatores de crescimento.

4.2 Efeito da adição de antioxidantes nos meios de cultivo *in vitro*

Para evitar danos induzidos pelo estresse oxidativo, vários antioxidantes intracelulares podem ser adicionados aos meios de cultivo para melhorar o desenvolvimento com sucesso variável (GOTO *et al.*, 1993). Compostos tiol de baixo peso molecular, como β -mercaptoetanol, cisteína, cistina e cisteamina, podem ser utilizados como suplementos do meio de maturação de oócitos (DE MATOS *et al.*, 1995; 1997) e de cultivo embrionário (CAAMAÑO *et al.*, 1996; LIM *et al.*, 1996; TAKAHASHI *et al.*, 1993).

Estes compostos são precursores para a síntese de GSH, que atua como principal sistema de defesa não enzimático em embriões. A GSH atua na manutenção do estado redox da célula protegendo-as contra os danos oxidativos (DELEUZE & GOUDET, 2010). Além de atuar como antioxidante, a GSH atua no transporte de aminoácidos (principalmente a cisteína), na síntese protéica e de DNA e na redução de dissulfitos. Ainda, a GSH é requerida para a eliminação de peróxidos lipídicos e proteínas tioladas, atua no controle da permeabilidade da membrana mitocondrial e na remoção de H_2O_2 em embriões (DE MATOS *et al.*, 2002). Desta forma, fica claro que a GSH sintetizada durante a maturação *in vitro* (MIV) tem relação com a competência do oócito para o posterior desenvolvimento embrionário (FURNUS *et al.*, 2008). Devido a isso, a concentração de GSH em

embriões está intimamente correlacionada com o desenvolvimento embrionário inicial e viabilidade após a criopreservação (GUÉRIN *et al.*, 2001).

A GSH é sintetizada em oócitos e embriões bovinos a partir do estágio de 8-16 células, após a transição materno-zigótica (HAMMOND *et al.*, 2001). Para neutralização das ROS, ocorre a reação de redução de duas moléculas de GSH com uma molécula de H_2O_2 , catalisada pela enzima glutathione peroxidase (GPX), originando uma molécula de glutathione oxidada (GSSG) e duas de H_2O . Em sequência, a GSSG é reduzida em GSH pela glutathione redutase na presença de NADPH (doador de elétrons) e, desta forma, há manutenção do equilíbrio de GSH e GSSG na proporção de 100:1 dentro das células (DELEUZE & GOUDET, 2010). A enzima MnSOD, presente na mitocôndria, atua como antioxidante removendo os radicais superóxidos e formando a espécie reativa de oxigênio H_2O_2 , que posteriormente será removida pela GPX ou pela catalase (CORRÊA *et al.*, 2008). Ainda, a GPX também atua na redução de hidroperóxidos lipídicos (GUÉRIN *et al.*, 2001), o que sugere seu papel central na proteção antioxidante celular. Devido a isto, a abundância de transcritos de GPX e de MnSOD pode ser correlacionada com uma melhor viabilidade embrionária.

Componentes de tiol, como a cisteína e o β -mercaptoetanol, reduzem a cistina em cisteína, disponibilizando-a para captação pelas células. A presença de cisteína no meio de cultivo é fator limitante para a síntese de GSH pelo oócito e embrião. O meio de maturação comumente utilizado nos sistemas de PIV de embriões, o TCM-199, possui baixa concentração de cisteína em sua composição (0,6 μ M). Além disso, a cisteína é rapidamente oxidada em cistina, o que por sua vez limita sua disponibilidade para a síntese de GSH (SAGARA *et al.*, 1993). De acordo com ALI *et al.* (2003), a suplementação com cisteína (0,6 mM) no meio de MIV ou CIV, durante as primeiras 72 horas de cultivo de desenvolvimento embrionário, melhorou a taxa de mórulas e blastocistos quando comparado com embriões cultivados sem suplementação com antioxidantes. Ainda, a suplementação com cisteína, β -mercaptoetanol e cistina no meio MIV de oócitos bovinos melhorou a taxa de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (DE MATOS *et al.*, 1997). Devido a isso, a adição de cisteína no meio MIV é de grande interesse para aprimorar o sistema de PIV de embriões bovinos.

A cisteamina, um antioxidante não enzimático, atua como um agente redutor. Ela interage diretamente com o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$), pode quelar alguns íons metálicos que potencializam os danos oxidativos (GUÉRIN *et al.*, 2001) e prevenir a oxidação da cisteína em cistina, visto que a última não consegue ser captada pelos oócitos de mamíferos. Logo, há maior disponibilidade de cisteína para captação pelas células e, conseqüentemente, aumento dos estoques intracelulares de GSH (ALI *et al.*, 2003).

Além da GSH, os sistemas biológicos desenvolveram outros mecanismos para controlar os níveis de ROS, incluindo mecanismos celulares enzimáticos como, por exemplo, a superóxido dismutase (SOD), catalase e peroxidases (CETICA *et al.*, 2001). Ainda, para modulação das ROS extracelulares, pode-se suplementar os meios de CIV com antioxidantes enzimáticos de ação extracelular (ALI *et al.* 2003). Por exemplo, a catalase é um antioxidante enzimático, que pode ser adicionado durante as etapas da PIV, e por ser impermeável atua removendo o H_2O_2 produzido no meio extracelular, como por exemplo o meio de cultivo (GUÉRIN *et al.*, 2001). Embora o mRNA para a maioria dos antioxidantes enzimáticos já tenham sido detectados em oócitos e embriões de mamíferos (LEQUARRÉ *et al.*, 2001), ainda há poucos e contraditórios estudos demonstrando os efeitos protetores destes antioxidantes em sistemas de PIV. De acordo com ALI *et al.* (2003), a suplementação com 5 ou 127 UI de catalase durante as primeiras 72 horas de CIV ou durante a MIV não melhorou as taxas de desenvolvimento embrionário. Por outro lado, Orsi & Leese (2001) demonstraram que a suplementação do meio CIV com 100 UI de catalase melhorou o desenvolvimento embrionário, através da redução do conteúdo de H_2O_2 . Mais recentemente, Rocha-Frigoni *et al.* (2014) demonstrou que a adição de catalase durante a PIV promoveu redução dos níveis intracelulares de ROS e da taxa de apoptose de embriões bovinos, de forma que estes resultados estimulam o aprofundamento de estudos visando a modulação das ROS extracelulares em sistemas de PIV.

Em suma, a suplementação com antioxidantes durante a MIV melhora a competência de oócitos para o desenvolvimento embrionário subsequente, podendo refletir em melhores taxas de sobrevivência embrionária *in vitro* pós-aquecimento de blastocistos bovinos PIV e vitrificados.

4.3 Fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) e seu papel biológico em oócitos e embriões bovinos

Os fatores de crescimento semelhante à insulina I e II (IGF-I e IGF-II) são polipeptídeos estruturalmente semelhantes à pró-insulina e se ligam à receptores específicos na superfície celular. Os IGFs circulam no plasma ligados à proteínas específicas, denominadas proteínas de ligação do IGF (do inglês, IGF-binding proteins – IGFBP) que, por sua vez, transportam o IGF até as células alvos (KANE *et al.*, 1997).

A insulina e os membros da família IGF são fatores de crescimento peptídicos de baixo peso molecular que atuam principalmente na regulação do crescimento e diferenciação celular. Tais fatores, em associação a diversos outros presentes no trato reprodutivo feminino, atuam de maneira autócrina ou parácrina na regulação da proliferação celular (BYRNE *et al.*, 2002).

Já foi demonstrada a presença do IGF-I e II no líquido folicular (SPICER & ECHTERNKAMP, 1995), em secreções uterinas e no trato reprodutivo (GABLER *et al.*, 1997), bem como a expressão de seus receptores (IGFR-I e IGFR-II) em oócitos e embriões bovinos (BLOCK, 2007). Sabe-se que a redução das IGFBPs pode ser correlacionada com o aumento da atividade proteolítica da proteína sérica A associada à prenhez (PAPP-A). Esta atua degradando as IGFBPs e, desta forma, aumenta a disponibilidade do IGF livre para exercer suas funções biológicas (MONGET *et al.*, 2003).

Os efeitos benéficos do IGF-I no desenvolvimento embrionário, tanto na presença quanto na ausência de estresse, foram demonstrados em diversas espécies (PALMA *et al.*, 1997). Diversos relatos indicam que fatores de crescimento, como o IGF-I, exercem efeito positivo sobre o desenvolvimento pré-implantacional por estimular o metabolismo e o crescimento embrionário via redução da apoptose e aumento do número total de blastômeros (LOTT *et al.*, 2010) e, ainda, por alterar o transporte de glicose (PANTALEON & KAYE, 1996).

Os IGFs estimulam a proliferação celular, mitogênese e a atividade de hormônios esteroides (KAMADA *et al.*, 1992). Ainda, estudos relatam que o IGF-I induz a mitose em células da granulosa (ARMSTRONG & XIA, 1993), maturação

oocitária (HARPER & BRACKETT, 1993) e desenvolvimento de embriões bovinos (KAYE *et al.*, 1992).

Mesmo quando blastocistos são submetidos a condições adversas, como estresse térmico (HANSEN, 2007) e oxidativo (MOSS *et al.*, 2009; KURZAVA *et al.*, 2002), o IGF-I atua como um fator de sobrevivência ao reduzir os efeitos deletérios sobre o desenvolvimento e viabilidade embrionária. De acordo com Block *et al.* (2008), a suplementação com IGF-I durante o cultivo *in vitro* reduziu a abundância de transcritos de Hsp70 (heat-shock proteins 70) em embriões bovinos, demonstrando que este fator de crescimento reduz os efeitos deletérios em condições de estresse celular e, conseqüentemente, melhora a sobrevivência embrionária através da alteração do padrão de expressão de diversos genes. Ainda, o IGF-I promove a inativação de proteínas com ação pró-apoptótica, como BAX e caspase-9, e induz de transcrição das proteínas anti-apoptóticas, como a Bcl-2 e Bcl-xL (HANSEN, 2007).

Foi também demonstrado por Moss *et al.* (2009) que a adição de IGF-I no meio de cultivo *in vitro*, na presença de 1 μ M de menadiona, inibiu o bloqueio do desenvolvimento embrionário decorrente da ação das ROS, demonstrando que este fator de crescimento pode atuar na redução da apoptose após condição de estresse oxidativo.

Pelo exposto, estão bem elucidados os efeitos benéficos do IGF sobre a proliferação e diferenciação celular. No entanto, o mecanismo pelo qual esses peptídeos atuam na proteção contra os danos decorrentes da ação da ROS ainda não é evidente.

4.4 Apoptose

Em mamíferos, a apoptose é um processo fundamental no controle da qualidade do desenvolvimento embrionário, em decorrência da eliminação de células danificadas, não funcionais e anormais (PAULA-LOPES & HANSEN, 2002). Este processo é regulado por uma sequência de eventos bioquímicos intracelulares com conseqüente fragmentação do DNA, diminuição do tamanho celular, condensação da cromatina, formação de corpos apoptóticos, peroxidação lipídica e aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial (VAN SOOM *et al.*, 2002).

A mitocôndria tem papel crucial no equilíbrio entre a prevenção e indução da apoptose mediante liberação do citocromo C e fator indutor de apoptose (AIF), que ativam as pró-caspases 2, 3 e 9 (SHCHEPINA, 2002). A família de genes Bcl-2 é uma das vias que atua na regulação da resposta apoptótica, sendo que suas proteínas podem inibir ou propagar o processo apoptótico (AFFORD & RANDHAWA, 2000). Resumidamente, a Bcl-2 previne a apoptose através da manutenção do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) e, conseqüentemente, inibe a liberação do citocromo C. A BAX por sua vez, altera o $\Delta\psi_m$ com conseqüente liberação do citocromo C e ativação das caspases 9 e 3, culminando com a apoptose celular (YANG & RAJAMAHENDRAN, 2002). Neste contexto, o $\Delta\psi_m$ é utilizado como indicador de atividade mitocondrial e pode auxiliar na compreensão de processos fisiológicos e patológicos nos quais a função mitocondrial está envolvida (VANBLERKOM *et al.*, 2003).

O acúmulo de superóxido e H_2O_2 em blastocistos parece estar relacionado com maiores taxas de apoptose. Como alternativa, a utilização de antioxidantes (GUÉRIN *et al.*, 2001) e de fatores de crescimento, como o IGF-I, reduz a porcentagem de células apoptóticas (MAKAREVICH *et al.*, 2002). Neste contexto, a suplementação com antioxidantes e fatores de crescimentos em diferentes etapas da PIV, sob condições de estresse oxidativo, poderia diminuir as taxas de apoptose e melhorar a resistência à criopreservação em embriões bovinos.

4.5 Criopreservação e criotolerância de embriões PIV

A criopreservação de embriões bovinos PIV oferece uma série de vantagens, como a preservação de material para o estabelecimento de bancos genéticos para uso futuro, armazenamento de embriões não transferidos, maior facilidade com relação ao intercâmbio comercial de animais/embriões entre diferentes regiões do território brasileiro ou mesmo com outros países, além de proporcionar a otimização do aproveitamento de gametas femininos.

A criopreservação visa manter o metabolismo celular em estado de quiescência, tornando possível a conservação de células e tecidos por tempo indeterminado. O primeiro sucesso desta técnica foi mencionado por Whittingham *et al.* (1971), utilizando embriões de camundongos. Desde então muitas pesquisas têm

sido realizadas para a criopreservação de embriões bovinos PIV, pois estes são mais sensíveis à criopreservação e tem as taxas de gestação significativamente menores após a transferência quando comparado com embriões produzidos *in vivo* também criopreservados (DOBRISNKY, 2002; HASLER, 1995; FAIR *et al.*, 2001; MARTINEZ *et al.*, 2006).

IMAI *et al.* (2002) relataram que os embriões PIV são mais sensíveis às baixas temperaturas e possuem criotolerância inferior quando comparados àqueles obtidos em condição *in vivo*. Este fato parece estar altamente correlacionado com o conteúdo lipídico intracitoplasmático de tais oócitos, havendo diferenças tanto na quantidade como na composição lipídica (SEIDEL *et al.*, 2006). Isto ocorre porque o sistema de cultivo *in vitro* pode influenciar a morfologia e o metabolismo do oócito e do embrião (LONERGAN *et al.* 2003.; RIZOS *et al.*, 2003). A aparência mais escura de embriões bovinos cultivados *in vitro* na presença de soro é atribuída a um aumento do conteúdo lipídico (ABE *et al.* 2002), uma vez que ocorre a captação de lipídeos provenientes do soro por oócitos bovinos maturados *in vitro* (KIM *et al.*, 1997, GENICOT *et al.*, 2005). O aumento de lipídeos intracelulares compromete a qualidade dos embriões, aumentando a sua sensibilidade ao estresse oxidativo e criopreservação (REIS *et al.*, 2003).

Devido ao fato de que a sensibilidade para refrigeração e criotolerância de oócitos e embriões de mamíferos está diretamente relacionada ao seu conteúdo lipídico (KIM *et al.*, 2001; ABE *et al.*, 2002; SEIDEL, 2006), recentes esforços tem focado a atenção na modificação da composição do meio de cultivo *in vitro* com a intenção de alterar o conteúdo lipídico de embriões. Por exemplo, o cultivo de embriões na ausência de soro fetal resulta em menor acúmulo lipídico intracitoplasmático e, conseqüentemente, melhora a criotolerância de tais embriões (RIZOS *et al.*, 2003).

Devido ao aumento da concentração lipídica no citoplasma de embriões durante o CIV, observa-se a ocorrência de peroxidação lipídica durante o cultivo, a criopreservação e no aquecimento. Após a criopreservação, os embriões PIV são ainda mais susceptíveis aos danos oxidativos, visto que sua estrutura ainda muito delicada não possui os mecanismos de defesa maduros (ALI *et al.*, 2002; NEDAMBALE *et al.*, 2006; HOSSEINI *et al.*, 2009). Observações feitas para

espermatozoides bovinos demonstram que a criopreservação diminui os estoques de GSH em 78% e de SOD em 50%, o que sugere que o estresse oxidativo ocorre durante e/ou após o ciclo de criopreservação/descongelação. Esse fato pode explicar a menor viabilidade observada em oócitos/embriões após a criopreservação (GUÉRIN *et al.*, 2001). Devido a isso, a suplementação com antioxidantes nos meio de CIV e de cultivo pós-descongelação melhora a viabilidade embrionária (NEDAMBALE *et al.*, 2006).

Há relatos de que a adição de antioxidantes, como o β -mercaptoetanol, durante os processos de aquecimento e cultivo embrionário pós-aquecimento é extremamente importante, visto que há aumento nas taxas de re-expansão e sobrevivência dos blastocistos (NEDAMBALE *et al.*, 2006). Segundo Feungang *et al.* (2004), a adição desse antioxidante desempenha um papel crítico no aumento da resistência de embriões vitrificados ao estresse oxidativo, o que consequentemente reduz a apoptose celular e fragmentação do DNA.

5. REFERÊNCIAS

AFFORD, S.; RANDHAWA, S. Apoptosis. **Mol. Pathol.**, v.53, p.55-63, 2000.

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

ARMSTRONG, D.T. and XIA, P. Differential mitogenic actions of insulin-like growth factor-I and FSH on bovine cumulus cells and granulosa cells. **Theriogenology**, v.39, p. 181, 1993.

BAIN, N.T.; MADAN, P.; BETTS, D.H. The early embryo to intracellular reactive oxygen species is developmentally regulated. **Reprod. Fert. and Develop.**, v.23, p.561-575, 2011.

BLOCK, J. Use of insulin-like growth factor-1 to improve post-transfer survival of bovine embryos produced *in vitro*. **Theriogenology**, v.68, p.49-55, 2007.

BLOCK, J; WRENZYCHI, C.; NIEMANN, H.; HERRMANN, D.; HANSEN, P.J. Effects of insulin-like growth factor-1 on cellular and molecular characteristics of bovine blastocysts produced *in vitro*. **Molecular Reprod. and Develop.**, v.75, p.895-903, 2008.

BYRNE, A.T.; SOUTHGATE, BRISON, D.R.; LEESE, H.J. Regulation of Apoptosis in the Bovine Blastocyst by Insulin and the Insulin-Like Growth Factor (IGF) Superfamily. **Molecular Reprod. and Develop.**, v.62, p.489-495, 2002.

CAAMAÑO, J.N.; RYOO, Z.Y.; THOMAS, J.A.; YOUNGS, C.R. β -Mercaptoethanol enhances blastocysts formation rate of bovine *in vitro*-matured/*in vitro*-fertilized embryos. **Biol. Reprod.**, v.57, p.1179-1263, 1996.

CETICA, P.D.; PINTOS, L.N.; DALVIT, G.C.; BECONI, M.T. Antioxidant enzyme system and oxidative stress in bovine oocyte *in vitro* maturation. **IUMBMB Life**, v.51, p.57-64, 2001.

CORRÊA, G. A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T. C. D.; FRANCO, M. M.; DODE, M.N. Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: Effect in production and expression of genes related with oxidative stress. **Animal Reproduction Science**, v.104, p. 132-142, 2008.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C; MOSES, D.F.; BALDASSARE, H. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocytes matured *in vitro*. **Mol. Reprod. Dev.**, v.42, p.432-438, 1995.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C; MOSES, D. F. Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. **Biol. Reprod.**, v.57, p.1420-1425, 1997.

DE MATOS, D.G.; HERRERA, C.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; VAN SOON, A.; NOGUIERA, D. Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine in vitro embryo production. **Mol.Reprod. Dev.**, v.62, p.203-202, 2002.

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

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

FUKUI, Y.; OYAMADA, T. Oxygen tension and medium supplements for in vitro maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined médium. **J. Reprod.**, v.50, n.1, p.107-117, 2004.

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

GABLER, C.; LAUER, B.; EINSPANIER, A.; SCHAMS, D.; EINSPANIER, R. Detection of mRNA and immunoreactive proteins for acidic and basic fibroblast growth factor and expression of the fibroblast growth factor receptors in the bovine oviduct. **J. Reprod. Fertil.**, v.109, p.213-221, 1997.

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

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

HAMMOND, C.L.; LEE, T.K.; BALLATORI, N. Novel roles for glutathione in gene expression, cell death and membrane transport of organic solutes. **J. Hepatol.**; v.34, p.946-954, 2001.

HANSEN, P.J. To be or not to be – Determinants of embryonic survival following heat shock. **Theriogenology**, v.68, p.40-48, 2007.

HARPER, K.M. and BRACKETT, G. Bovine blastocysts development after *in vitro* maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. **Biology of Reproduction**. v.48, p.409-416, 1993.

HARVEY, M.B.; ARCELLANA-PANLILIO, M.Y.; ZHANG, X.; SCHULTZ, G.A.; WATSON, A.J.. Expression of genes encoding antioxidants enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures employed for embryo co-cultured. **Biol. Reprod.**, v.53, p.532-572, 1995.

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

KAMADA, S.; KUBOTA, T.; TAGUCHI, M.; HO, W.R.; SAKAMOTO, S.; ASO, T. Effects of insulin-like growth factor-II on proliferation and differentiation of ovarian granulosa cells. **Horm. Res.** v.37, p. 141–149, 1992.

KANE, M.T.; MORGAN, P.M.; COONAN, C. Peptide growth factors and preimplantation development. **Hum. Reprod. Update.**, v.3, p.137-157, 1997.

KAYE, P.L.; BELL, K.L.; BEEBE, L.F.; DUNGLISON, L.F.S.; GARDNER, H.G.; HARVEY M.B. Insulin-like growth factors (IGFs) in preimplantation development. **Reprod. Fertil. and Dev.**, v. 4, p. 373-386, 1992.

KENT W.J.; SUGNET C.W.; FUREY T.S.; ROSKIN K.M.; PRINGLE T.H.; ZAHLER A.M.; HAUSSLER D. The human genome browser at UCSC. **Genome Res.**, v.12, p. 996-1006, 2002.

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

KURZAWA, R.; GLABOWSKI, W.; BACZKOWSKI, T.; BRELIK, P. Evaluation of mouse preimplantation embryos exposed to oxidative stress cultured with insulin-like growth factor I and II, epidermal growth factor, insulin, transferrin and selenium. **Reprod Biol**, v.2, p.143–162, 2002.

LIM, J.M.; LIOU, S.S.; HANSEL, W. Intracytoplasmatic glutathione concentration and the role of beta-mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. **Theriogenology**, v.20, p.407-423, 1996.

LEQUARRE, A.S.; FEUGANG, J.M.; MALHOMME, O.; DONNAY, I.; MASSIP, A.; et al. Expression of Cu/Zn and Mn superoxide dismutases during bovine embryo development: influence of *in vitro* culture. **Mol. Reprod. Dev.**, v.58, p.45-53, 2001.

LOTT, W.M.; ANCHAMPARUTHY, V.M.; MCGILLIARD, M.L.; MULLARKY, I.K.; AND GWAZDAUSKAS, F.C. Influence of cysteine in conjunction with growth factors on the development o *in vitro*-produced bovine embryos. **Reprod. Dom. Anim.**, v.46, p.585-594, 2010.

MAKAREVICH, A.V AND MARKKULA, M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during *in vitro* maturation and culture. **Biol. of Reprod.**, v.66, p.386-392, 2002.

MONGET, P.; MAZERBOURG, S.; DELPUECH, T.; MAUREL, M.C.; MANIÈRE, S.; ZAPF, J.; LALMANACH, G.; OXVIG, C.; OVERGAARD, M.T. Pregnancy-associated plasma protein-A is involved in insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) proteolytic degradation in bovine and porcine preovulatory follicles: identification of cleavage site and characterization of IGFBP-2 degradation. **Biol. Reprod.**, v.68, p.77-86, 2003.

MONKS, T.J.; HANZLIK, R.P.; COHEN, G.M.; ROSS, D.; GRAHAM, D.G. Quinone chemistry and toxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 112, p.2-16, 1992.

MOSS, J.I.; PONTES, E.; HANSEN, P.J. Insulin-like growth factor-1 protects preimplantation embryos from anti-developmental actions of menadione. **Arch. Toxicol.**, v.83, p.1001-1007, 2009.

NABENISHI, H.; OHTA, H.; NISHIMOTO, T.; MORITA, T.; ASHIZAWA, K.; TSUZUKI, Y. The effects of cysteine addition during *in vitro* maturation on the development competence, ROS, GSH and apoptosis level of bovine oocyte exposed to heat-stress. **Zygote**, doi:10.1017/S0967199411000220, p.1-11, 2011.

NARS-ESFAHANI, M.H.; JOHNSON, M.H. The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured *in vitro*. **Development.**, v.113, p.551-611, 1991.

NEDAMBALE, T.; DU, F.; YANG, X.; TIAN, X. Higher survival rate of vitrified and thawed *in vitro* produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with beta-mercaptoethanol. **Anim. Reprod. Sci.**, v.93, p.61-75, 2006.

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

PALMA, G.A.; MÜLLER, 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 Reprod. and Fertil.**, v.110, p.347-353, 1997.

PANTALEON, M. AND KAYE, P.L. IGF-I and insulin regulate glucose transport in mouse blastocysts via IGF-I receptor. **Molecular Reprod. and Develop.**, v.44, p.71-76, 1996.

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

PIERCE, J.D.; CACKLER, A.D.; ARNETT, M.G. Why should you care about free radicals? **RN.**, v.67, p.38-42, 2004.

ROCHA-FRIGONI, N.A.; LEÃO, B.C.; NOGUEIRA, É.; ACCORSI, M.F.; MINGOTI, G.Z. Reduced levles of intracelular reactive oxygen species and apoptotic status are

not correlated with increases in cryotolerance of bovine embryos produced *in vitro* in the presence of antioxidants. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.26, p.797-805, 2014.

ROCHA-FRIGONI, N.A.; LEÃO, B.C.; NOGUEIRA, É.; MINGOTI, G.Z. Effect of gaseous atmosphere and antioxidants on the development and cryotolerance of bovine embryos at different periods of *in vitro* culture. **Zygote**, v.23, p.159-168, 2015.

SAGARA, J.; MIURA, K.; BANNAI, S. Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and suspension. **J Neurochem.**, v.61, p.1667-1738, 1993.

SHCHEPINA, L.A.; et al. Respiration and mitochondrial membrane potential are not required for apoptosis and anti-apoptotic action of BCL-2 in hela cells. **Biochemistry (Moscow)**, v.67, p.222-226, 2002.

SPICER, L.J.; ECHTERNKAMP, S.E. The ovarian insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. **Domest Anim Endocrinol**, v.12, p.223–245, 1995.

SUDANO, M.J.; PASCHOAL, D.M.; RASCADO, T.S.; MAGALHÃES, L.C.O.; CROCOMO, L.F.; LIMA-NETO, J.F.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Lipid content and apoptosis of *in vitro*-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. **Theriogenology**, v.75, p.1211-1220, 2011.

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. **Biol. Reprod.**, v.49, p.228-264, 1993.

TAKAHASHI, M. Oxidative stress and redox regulation on *in vitro* development of mammalian embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v.58, p.1-9, 2012.

TVRDÁ, E.; KNAZICKÁ, Z.; BÁRDOS, L.; MASSÁNYI, P.; LUKÁC, N. Impact of oxidative stress on male fertility – a review. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.59, p.465-484, 2011.

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

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

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

VANBLERKOM, J.; DAVIS, P.; ALEXANDER, S. Inner mitochondrial membrane potencial ($\Delta\psi_{mm}$), cytoplasmic ATP content and free Ca^{2+} levels in metaphase II mouse oocyte. **Human Reproduction**, v.8, p.2429-2440, 2003.

YANG, M.Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Expression of Bcl-2 and BAX proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. **Animal Reprod. Scien.**, v.70, p.159-169, 2002.

CAPÍTULO 2 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTES DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* SOBRE A QUALIDADE E AQUISIÇÃO DE COMPETÊNCIA OOCITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

RESUMO – Neste estudo foi avaliado se: (1) o sistema de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos gera estresse oxidativo; (2) a suplementação do meio de MIV com antioxidantes intracelulares (cisteína e cisteamina; C+C) e/ou extracelulares (catalase; CAT) altera a concentração intracelular de ROS e de glutathiona (GSH), o potencial de membrana mitocondrial, maturação nuclear e ocorrência de apoptose em oócitos bovinos, bem como o desenvolvimento embrionário subsequente. A taxa de maturação nuclear não foi afetada pelos tratamentos (76,7% a 80,0%; $P > 0,05$). A porcentagem de apoptose do grupo C+C+CAT (10,8%) foi superior ($P < 0,05$) ao grupo CAT (1,9%), porém os grupos Controle (5,8%) e C+C (5,5%) não diferiram dos demais grupos ($P > 0,05$). Os níveis intracelulares de ROS encontrados nos grupos C+C e C+C+CAT (1,06; média) foram tão baixas como a observada em oócitos imaturos (0h: 1,00), e o maior ($P < 0,05$) acúmulo de ROS foi encontrado no grupo Controle (1,91). A concentração intracelular de GSH foi reduzida ($P < 0,05$) em todos os grupos (0,17 a 0,51) quando comparados aos oócitos imaturos (1,00), no entanto os grupos Controle, CAT e C+C+CAT (0,23; média) apresentaram menores ($P < 0,05$) concentrações de GSH comparados ao grupo C+C (0,51). O potencial de membrana mitocondrial aumentou (1,6; média) em todos os grupos ($P < 0,05$) quando comparado com os oócitos imaturos (0h: 1,00), com exceção do grupo C+C (0,94). A taxa de blastocistos foi maior ($P < 0,05$) no grupo C+C+CAT (46,2%) em comparação com os outros grupos (28,2% a 33,3%). Em conclusão, a suplementação antioxidantes intra- e extracelulares durante a MIV reduziu os níveis intracelulares de ROS e aumentou o potencial de membrana mitocondrial em oócitos bovinos, levando a um aumento na competência oocitária para o desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: oócito, estresse oxidativo, bovino

1. INTRODUÇÃO

Muitas tentativas têm sido feitas para melhorar os resultados da produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos através do aprimoramento das condições dos sistemas de cultivo, especialmente durante a etapa de maturação *in vitro* (MIV). Este é um passo crucial porque a aquisição de competência de oócitos maturados *in vitro* (MIV) é inferior quando comparado aos maturados *in vivo*. Sabe-se que o ambiente de cultivo aos quais oócitos e embriões são expostos pode afetar sua qualidade (MINGOTI *et al.*, 2009; MINGOTI *et al.*, 2011; ROCHA-FRIGONI *et al.*, 2014; ROCHA-FRIGONI *et al.*, 2015) e entre os diversos fatores que podem influenciar as condições de cultivo, nas últimas décadas têm se dado atenção especial ao estresse oxidativo induzido pela elevada tensão de oxigênio (CÔRREA *et al.*, 2008). A tensão de oxigênio rotineiramente utilizada nos sistemas de PIV é frequentemente mais elevada do que a encontrada no trato reprodutor feminino (~ 20% e 3 a 9% de O₂, respectivamente) e essa elevada tensão de oxigênio resulta em produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o radical superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical hidroxila (OH[·]) que correspondem à redução de um, dois e três elétrons, respectivamente. Juntamente com a elevada tensão de oxigênio, outros fatores exógenos capazes de induzir a produção de ROS podem ser encontrados no meio de cultivo, incluindo traços de cátions metálicos, tais como Fe e Cu, frequentemente presentes na água e/ou produtos químicos utilizados para a preparação dos meios de cultivo, ou a aminooxidase encontrados no soro (GUÉRIN *et al.*, 2001; MARTÍN ROMERO *et al.*, 2008).

A produção de ROS é um processo normal que ocorre no interior das células, incluindo as células de cumulus, embriões e oócitos (GUÉRIN *et al.*, 2001). Sob condições fisiológicas, a principal fonte de ROS é a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, como um resultado da reação de transferência de elétrons para o oxigênio (FEUGANG *et al.*, 2004). Embora as ROS estejam envolvidas em muitos processos fisiológicos relacionados com a atividade do ovário e a gametogênese (BERHMAN *et al.*, 2001), na capacidade fertilizante dos espermatozoides bovinos e na interação entre os espermatozoides e oócitos (GONÇALVES *et al.*, 2010), o

estresse oxidativo ocorre quando a produção de ROS excede os mecanismos celulares de defesa antioxidantes, resultando em perturbações dos processos regulados por reações de redução-oxidação (redox). Estes radicais são extremamente reativos e instáveis, e podem interagir com diversas moléculas para adquirirem elétrons e, assim, tornarem-se estáveis (DELEUZE & GOUDET, 2010). Estas interações podem, por sua vez, induzir uma cascata de reações em cadeia, culminando em danos celulares, incluindo a peroxidação lipídica (principalmente fosfolipídios de membrana) e oxidação de aminoácidos e ácidos nucleicos (GUÉRIN *et al.*, 2001; BAIN *et al.*, 2011; PIERCE *et al.*, 2004). Além disso, elevados níveis de ROS podem causar danos no DNA, em decorrência da ruptura das membranas mitocondriais com a consequente liberação de citocromo C e ativação da cascata de caspases, culminando em apoptose e falha do desenvolvimento embrionário (TRVDÁ *et al.*, 2011). Assim, o estresse oxidativo pode subsequentemente diminuir a viabilidade dos embriões produzidos *in vitro* (KITAGAWA *et al.*, 2004).

Com intuito de minimizar os danos decorrentes do estresse oxidativo, os sistemas biológicos desenvolveram mecanismos antioxidantes para controlar os níveis de ROS, tanto com ação enzimática (superóxido dismutase, a glutathione peroxidase, catalase) como não enzimática (α -tocoferol, ácido ascórbico, β -caroteno e glutathione, entre outros) (JOHNSON *et al.*, 1994). Desta forma, dada a constante ameaça à viabilidade celular impostas pela ação das ROS, estes antioxidantes têm sido utilizados nos sistemas de cultivo para a produção de embriões bovinos, com o objetivo de melhorar a qualidade de oócitos e embriões *in vitro*. Relatos presentes na literatura são muito controversos sobre os efeitos da suplementação com antioxidantes enzimáticas extracelulares, como a catalase (ORSI E LEESE, 2001; ALI *et al.*, 2003). No entanto, recentemente foi demonstrado que a adição de catalase durante a PIV reduziu os níveis intracelulares de ROS e a taxa de apoptose em embriões bovinos (ROCHA-FRIGONI *et al.*, 2014) e este achado estimula estudos futuros sobre a modulação da produção extracelular de ROS, visando melhorar o sistema de PIV.

Mais atenção têm sido dada à suplementação do meio de MIV com compostos de tiol, tais como cisteína ou cistina (DE MATOS *et al.*, 2000) e cisteamina (DELEUZE & GOUDET, 2010), que aumentam os níveis intracelulares de

glutathiona (GSH) em oócitos bovinos. Alterações na concentração de GSH e no estado redox têm sido associados com o estresse oxidativo induzido por peróxidos e outros agentes oxidantes na mitocôndria (LASH *et al.*, 2006). O GSH atua como o principal sistema de defesa não enzimática em oócitos e embriões para promover a desintoxicação de peróxidos lipídicos e proteínas tioladas e a remoção do H_2O_2 (JOHNSON *et al.*, 1994). A biossíntese da GSH é limitada pela disponibilidade de cisteína no meio de cultivo, no entanto, esta substância é instável fora da célula e, provavelmente, pouca cisteína esteja presente no meio de cultivo devido à sua auto-oxidação em cistina (CURNOW *et al.*, 2008). Os compostos de tiol de baixo peso molecular, tais como a cisteamina e β -mercaptoetanol, promovem a redução de cistina em cisteína, aumentando a captação de cisteína e síntese de GSH (DELEUZE & GOUDET, 2010).

O estado redox do GSH e de outros compostos de tiol são considerados fundamentais para o funcionamento e atividade mitocondrial (LASH *et al.*, 2006). No que se diz respeito à oócitos e embriões, a função mitocondrial é um parâmetro importante para avaliar a competência, por desempenharem papel vital através da produção de adenosina trifosfato (ATP) para a maioria das reações metabólicas celulares, incluindo o ciclo de Krebs, metabolismo dos ácidos graxos, da ureia e de metabólitos hormonais, e também da sua função no armazenamento de mediadores de apoptose/necrose e sobrevivência celular, íons e outros co-fatores importantes para a regulação da homeostase (TARAZONA *et al.*, 2006; SCHEFFLER *et al.*, 1999).

No presente estudo, temos como hipótese que a melhoria da qualidade do oócito ao final da etapa de maturação *in vitro*, através do aumento da concentração intracelular de GSH e da função mitocondrial, aumentaria a aquisição de competência oocitária para o desenvolvimento embrionário. Portanto, neste estudo foi avaliado se: (1) o sistema de MIV de oócitos bovinos gera estresse oxidativo; (2) a suplementação do meio de MIV com antioxidantes intracelulares (cisteína e cisteamina; C+C) e/ou extracelulares (catalase; CAT) melhora o sistema de cultivo e altera os níveis intracelulares de ROS e GSH, o potencial de membrana mitocondrial em oócitos bovinos ao final da maturação, bem como o desenvolvimento embrionário subsequente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes químicos

Os reagentes utilizados foram da empresa Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), caso contrário estão especificados no texto. Todos os reagentes são testados pra cultivo celular. O meio de MIV utilizado foi o TCM-199 (Gibco, Invitrogen Co., Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Invitrogen Co.), 0,2 mM de piruvato, 25 mM de bicarbonato de sódio, 50 µg/mL de amicacina, 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin-V, Bionique Animal Health, Ontario, Canadá) e 100 UI/mL de hCG (Vetecor, Hertape Calier). O meio de fertilização utilizado foi o *Tyrode's albumin lactate pyruvate* (TALP), previamente descrito (PARRISH *et al.*, 1988), contendo 0,2 mM de piruvato, 13 mM de lactato de sódio, 50 µg/mL de amicacina e 40 µL/mL de solução de PHE (20 µM de penicilamina, 10 µM hipotaurina, e 2 µM epinefrina), 10 µg/mL heparina e 6 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) livre de ácidos graxos. Materiais plásticos e tubos foram obtidos da empresa Corning Inc. (Acton, MA, USA). O meio de cultivo embrionário utilizado foi o *Synthetic Oviduct Fluid* (SOF) modificado, previamente descrito (VAJTA *et al.*, 1999) suplementado com 0,2 mM de L-glutamina, 0,34 mM de citrato de sódio, 2,8 mM de myo-inositol, 2% de BME aminoácidos essenciais, 1% MEM aminoácidos não essenciais, 50 µg/mL de amicacina, 5 mg/mL de BSA e 2,5% (v/v) de SFB.

Obtenção de oócitos e maturação *in vitro*

Ovários de vacas abatidas em frigoríficos foram transportados até o laboratório a uma temperatura entre 30-35°C. Complexos *cumulus*-oócitos (COCs) foram aspirados de folículos antrais (3-8 mm de diâmetro), com seringa acoplada a uma agulha 18-G. O material aspirado foi transferido para tubos de 50 mL e decantado por 15 minutos e somente oócitos circundados com pelo menos quatro camadas de células do *cumulus* compactas e com citoplasma contendo granulação homogênea foram selecionados para o cultivo de maturação. Os COCs selecionados (n=1791) foram lavados e cultivados em meio de maturação TCM-199

com ou sem a suplementação com antioxidantes como segue: 1) 0,6 mM de cisteína associado a 100 μ M de cisteamina (C+C); 2) 100 UI de catalase (CAT); 3) 0,6 mM de cisteína associado a 100 μ M de cisteamina e 100 UI de catalase (C+C+CAT); ou 4) sem a suplementação com antioxidantes (Controle). Foram transferidas 50 estruturas para cada poço da placa de cultivo de 4 poços (NUNC®, Nunclon Delta Treated 4-well IVF Dish, Denmark), contendo 500 μ L de meio de maturação (as diferenças entre os grupos estão descritas no delineamento experimental). O cultivo de maturação foi realizado em atmosfera de 5% CO₂ em ar e com máxima umidade, durante 22 horas.

Separação espermática e fertilização *in vitro*

Ao término da MIV, os oócitos foram submetidos à fecundação utilizando sêmen de um único touro Nelore (*Bos indicus*) da mesma partida e com fertilidade comprovada para produção *in vitro*. As palhetas foram descongeladas à temperatura de 36°C por 40 segundos e os espermatozoides móveis foram selecionados e separados do diluidor por centrifugação em gradiente de densidade descontínua de Percoll (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) em duas fases (250 μ L de Percoll 45% sobre 250 μ L de Percoll 90%, em microtubo de 1,5 mL) a 2500xg por 7 minutos. O sedimento recuperado foi avaliado quanto ao volume, concentração e motilidade espermática. A concentração espermática utilizada foi 2×10^6 espermatozoides/mL de meio de fertilização. Foram adicionados 25 oócitos/gota, onde permaneceram em atmosfera de 5% de CO₂ em ar a 38,5°C durante 18-22 horas. O dia da fertilização foi considerado como Dia 0.

Cultivo embrionário *in vitro*

Após a fertilização os prováveis zigotos foram transferidos para o meio de CIV e cultivados em monocamada de células do cumulus. O cultivo foi realizado em poços de placas de cultivo de 4 poços (NUNC®, Nunclon Delta Treated 4-well IVF Dish, Denmark) contendo 500 μ L de meio SOF suplementado 0,5% de BSA e 2,5% de SFB em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ em ar e temperatura de 38,5°C por até sete dias. Após 72 horas de cultivo, 50% do meio de cultivo foi

renovado. A clivagem foi avaliada 72 horas pós-inseminação (hpi) e o desenvolvimento embrionário foi avaliado às 168 hpi (Dia 7).

Determinação da taxa de apoptose e avaliação da maturação nuclear

A fragmentação do DNA em oócitos foi observada após a marcação das células em apoptose pela coloração “*In situ* terminal deoxinucleotidyl transferase mediated dUTP Nick end labeling assay” (TUNEL; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), conforme recomendação do fabricante. Os oócitos foram desnudados por sucessivas pipetagens em solução de hialuronidase 0,2% em PBS, acrescido de 1% PVP (PBS-PVP). Posteriormente, foram fixados em paraformaldeído 4% por 1 hora e foram permeabilizados em solução de Triton X-100 (0,5%, v/v) em citrato de sódio (0,1%), por 30 minutos a temperatura ambiente.

Os oócitos do controle positivo foram incubados com DNase I (50 UI/mL de água Milli-Q) (RNase free) a 37°C por 1 hora, sendo que durante este período os embriões dos tratamentos permaneceram em PBS-PVP. Subsequentemente, foram incubados em 10 µL da mistura para a reação TUNEL (proporção de 1:9, enzima e tampão) por 1 hora em câmara úmida à 37°C, no escuro. Os oócitos do controle negativo foram incubados na ausência da enzima. Posteriormente, foram incubados em solução Hoechst 33342 (1 µg/mL de PBS-PVP) por 30 minutos, em temperatura ambiente.

Por fim, foram lavados em PBS-PVP e colocados entre lâmina e lamínula com glicerina tamponada (9:1). Posteriormente, foram avaliados em microscópio equipado com epifluorescência (Olympus, IX51), excitação de 510-550 nm e emissão de 590 nm, quanto à fragmentação de DNA (TUNEL positivas = fluorescência verde ou amarelada pontual dentro no núcleo) e excitação 404 nm e emissão 526 nm para determinação do estágio da meiose. Os oócitos classificados em VG foram considerados imaturos e aqueles que apresentaram placa metafásica e extrusão do primeiro corpúsculo polar foram classificados em MII. Oócitos em estádios de maturação entre VG e MII (quebra da vesícula germinativa - GVBD, metáfase I - MI, anáfase I – AI ou telófase I - TI) foram classificados em estádios intermediários (INT) da meiose. A coloração foi realizada em oócitos imediatamente

após a remoção do folículo (0 hora) e após a MIV (22 horas). Imagens representativas desta coloração podem ser observadas na Figura 1.

Mensuração do conteúdo intracelular de GSH reduzida

O conteúdo intracelular de GSH reduzida foram quantificados através da utilização da sonda fluorescente ThiolTracker™ Violet (Glutathione Detection Reagent; Molecular probes, Invitrogen, Oregon, USA) de acordo com as informações do fabricante. Resumidamente, os oócitos foram desnudados e lavados duas vezes em PBS e, posteriormente, incubados em 20 μ M de ThiolTracker™ Violet durante 30 minutos no escuro, a 37,0°C em 5% de CO₂ em ar. Posteriormente, foram lavados duas vezes em PBS e foram avaliados imediatamente em microscópio invertido equipado com epifluorescência (Olympus, IX51), sob excitação de 404 nm e emissão de 526 nm. As imagens foram fotografadas e analisadas pelo programa Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc., Version 5.0.1.26) para quantificação da intensidade de fluorescência emitida (pixels). A intensidade do sinal de “background” foi subtraída dos valores medidos das imagens. Uma das amostras experimentais foi escolhida como o calibrador (grupo 0h) e o valor de cada imagem foi dividido pela média do calibrador para gerar os níveis de expressão relativa de fluorescência (unidades arbitrárias de fluorescência). A coloração foi realizada em oócitos imediatamente após a remoção do folículo (0 horas) e após a MIV (22 horas). Imagens representativas desta coloração podem ser observadas na Figura 1.

Mensuração do conteúdo intracelular de ROS pelo ensaio com diclorofluoresceína

O conteúdo intracelular de ROS (H₂O₂, HO•, ROO•) foram quantificados através da sonda fluorescente diacetato de 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA; Molecular Probes), como descrito por Bain *et al.* (2011). O procedimento foi realizado nos oócitos após a remoção das células do cumulus. Os oócitos foram lavados duas vezes em PBS e incubados em 5 μ M de H₂DCFDA durante 30 minutos, no escuro, a 38,5°C e 5% de CO₂ em ar. Posteriormente, foram lavados duas vezes em PBS e avaliados imediatamente em microscópio invertido equipado com epifluorescência (Olympus IX51; excitação de 495 nm e emissão de 520 nm).

As imagens obtidas foram posteriormente analisadas pelo programa Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc. Version 5.0.1.26) para quantificação da intensidade de fluorescência emitida, mensurada em pixels. A intensidade do sinal de “background” foi subtraída dos valores medidos das imagens. Uma das amostras experimentais foi escolhida como o calibrador (grupo 0h) e o valor de cada imagem foi dividido pela média do calibrador para gerar os níveis de expressão relativa de fluorescência (unidades arbitrárias de fluorescência). Quanto maior a intensidade de fluorescência, maior o conteúdo intracelular de ROS. A coloração foi realizada em oócitos imediatamente após a remoção do folículo (0 horas) e após a MIV (22 horas). Imagens representativas desta coloração podem ser observadas na Figura 1.

Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) foi avaliado pela coloração com MitoTracker Red[®] (CMXROs, Molecular Probes), de acordo com as recomendações do fabricante. O procedimento nos oócitos foi realizado após a remoção das células do cumulus. Os oócitos foram lavados duas vezes em PBS e incubados em 0,5 μ M de MitoTracker Red[®] durante 30 minutos, no escuro, a 38,5°C e 5% de CO₂ em ar. Posteriormente, foram lavados duas vezes em PBS e avaliados imediatamente em microscópio invertido equipado com epifluorescência (Olympus, IX51; 543 nm de excitação e 575 nm de emissão). As imagens obtidas foram armazenadas e posteriormente processadas e analisadas pelo software Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc., Versão 5.0.1.26) para quantificação da intensidade de fluorescência emitida, mensurada em pixels. A intensidade do sinal de “background” foi subtraída dos valores medidos das imagens. Uma das amostras experimentais foi escolhida como o calibrador (grupo 0h) e o valor de cada imagem foi dividido pela média do calibrador para gerar os níveis de expressão relativa de fluorescência (unidades arbitrárias de fluorescência). Quanto maior a intensidade de fluorescência, maior o potencial de membrana mitocondrial. A coloração foi realizada em oócitos imediatamente após a remoção do folículo (0 horas) e após a MIV (22 horas). Imagens representativas desta coloração podem ser observadas na Figura 1.

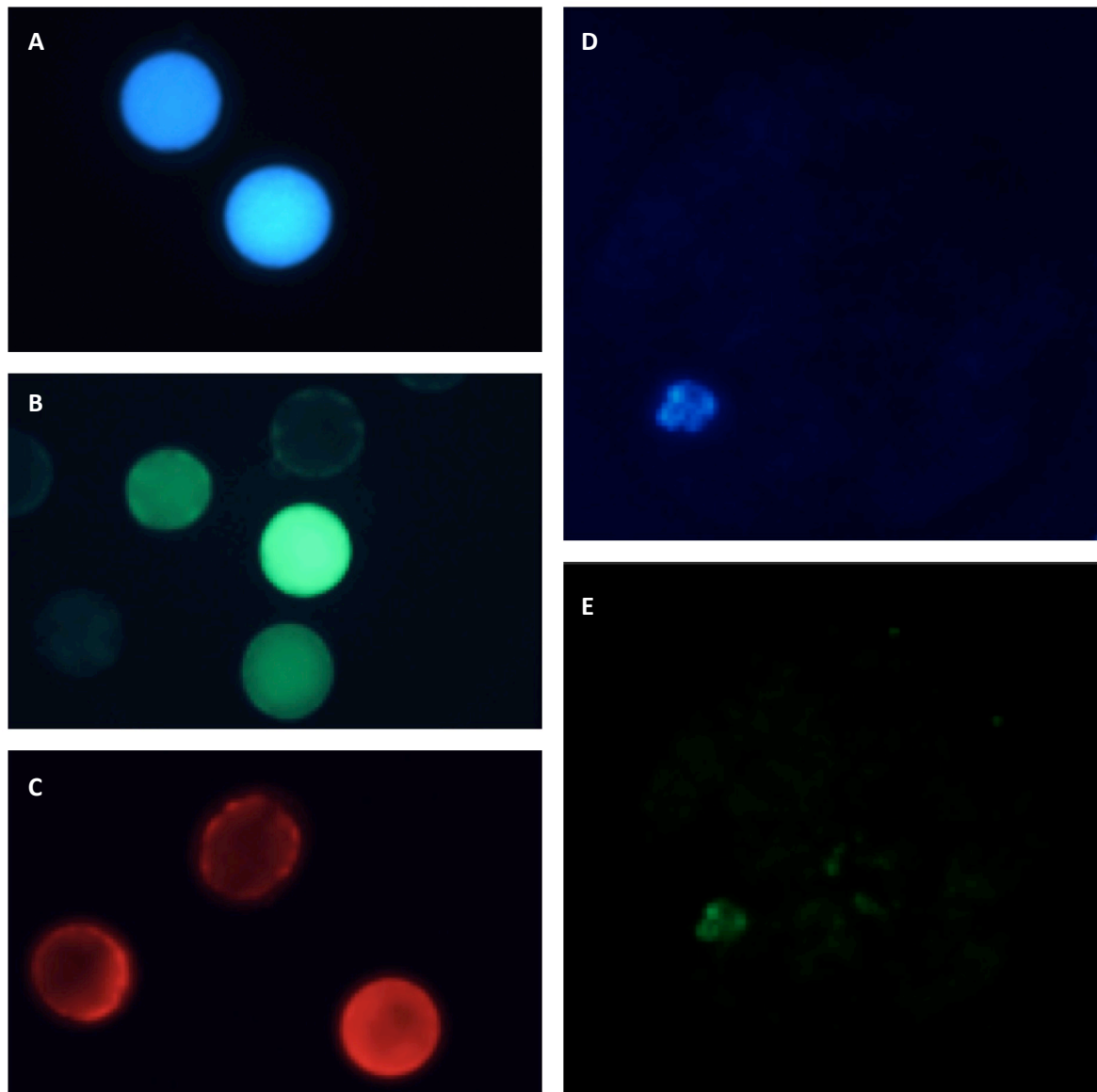


Figura 1. Imagem ilustrativa de oócitos bovinos corados com a sonda fluorescente ThiolTracker Violet para detecção da glutathiona (GSH) intracelular (A); com a sonda fluorescente H_2DCFDA para detecção das espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelulares (B); com a sonda fluorescente MitoTracker Red para avaliação do potencial de membrana mitocondrial (C); com a sonda fluorescente Hoechst 33342 para a identificação do material nuclear (em azul, D); e ensaio TUNEL para a determinação da fragmentação nuclear (em verde, E). Os oócitos foram avaliados em microscopia de epifluorescência (ver no texto o detalhamento dos filtros utilizados para cada sonda). Aumento 20 X.

Análise estatística

Dentro de cada replicata, um poço da placa de cultivo contendo 50 oócitos foi considerada a unidade experimental para cada grupo. O experimento foi repetido no mínimo 5 vezes, em dias diferentes.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando um efeito estatisticamente significativo foi encontrado, comparações múltiplas das médias foram determinadas pelo teste de Tukey (JMP versão 5.0.1, SAS Institute). Os dados de porcentagens foram transformadas utilizando arco-seno raiz quadrada. As variáveis binomiais foram analisadas pelo teste de Qui-Quadrado. Diferenças com probabilidades (P) menores que 0,05 foram consideradas significativas.

3. RESULTADOS

Os resultados para os estádios da maturação nuclear em oócitos está sumarizado na Tabela 1. Não houve diferença ($P>0,05$) entre os grupos com relação aos oócitos nos estádios de VG (10,6 a 14,5%), INT (5,5 a 12,5%) e MII (76,6 a 80,0%) ao final da MIV. Dos oócitos que foram avaliados imediatamente após a aspiração folicular (0h), 98,4% se encontravam em estágio de VG, 1,6% em INT e 0% em MII (dados não demonstrados na tabela). A porcentagem de apoptose (núcleo TUNEL-positivo) do grupo C+C+CAT (10,8%) foi superior ($P<0,05$) ao grupo CAT (1,9%); e os grupos Controle (5,8%) e C+C (5,5%) não diferiram dos demais grupos ($P>0,05$).

Tabela 1. Fase da maturação nuclear e ocorrência de apoptose em oócitos bovinos MIV em meio suplementado com diferentes antioxidantes.

Grupos	N oócitos	Fase da meiose			TUNEL Positivo n (%)
		VG n (%)	INT n (%)	MI n (%)	
Controle	120	13 (10,8)	15 (12,5)	92 (76,7)	7 (5,8) ^{ab}
C+C	110	16 (14,5)	6 (5,5)	88 (80,0)	6 (5,5) ^{ab}
CAT	104	11 (10,6)	10 (9,6)	83 (79,8)	2 (1,9) ^a
C+C+CAT	102	12 (11,8)	10 (9,8)	80 (78,4)	11(10,8) ^b

Maturação nuclear e apoptose em oócitos bovinos MIV em meio suplementado ou não com diferentes antioxidantes. Controle = oócitos submetidos à MIV sem suplementação com antioxidantes. C+C = oócitos submetidos à MIV com suplementação de cisteína 0,6 mM associado com cisteamina 100 µM. CAT= oócitos submetidos à MIV com suplementação de 100 UI catalase. C+C+CAT = oócitos submetidos à MIV com suplementação de cisteína 0,6 mM associado com cisteamina 100 µM e 100 UI catalase. Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo Teste de Qui-Quadrado ($P<0,05$).

O acúmulo intracelular de GSH em oócitos bovinos (Figura 2), expressos em unidades arbitrárias de fluorescência, foram reduzidos ($P<0,05$) em todos os grupos experimentais ($0,17\pm0,09$ a $0,51\pm0,05$) quando comparados ao grupo 0h ($1,00\pm0,08$). Não houve diferença ($P>0,05$) entre os grupos Controle ($0,24\pm0,02$), CAT ($0,28\pm0,03$) e C+C+CAT ($0,17\pm0,08$), e esses grupos apresentaram concentrações menores de GSH ($P<0,05$) comparados ao grupo C+C ($0,51\pm0,05$).

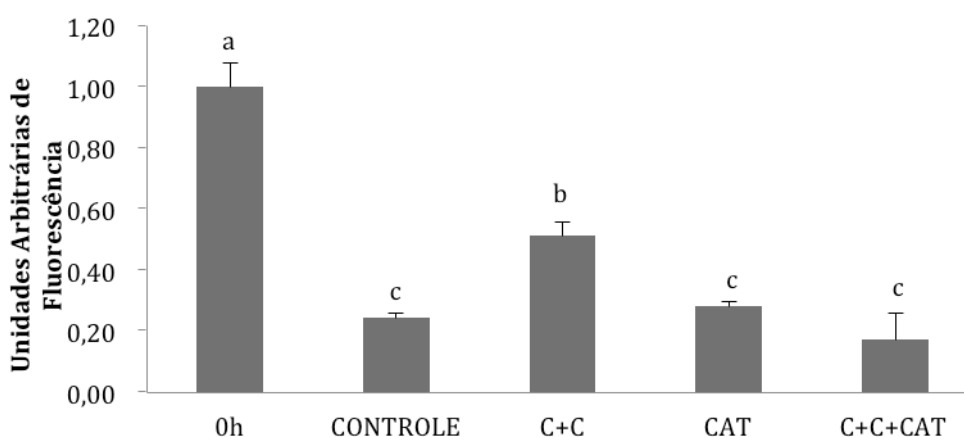


Figura 2. Concentrações intracelulares de GSH (quantificados em unidades arbitrárias de fluorescência) em oócitos maturados *in vitro* em meio suplementado ou não com antioxidantes. 0h = Oócitos imaturos. Controle = oócitos submetidos à MIV sem suplementação com antioxidantes. C + C = oócitos submetidos à MIV com suplementação de cisteína 0,6 mM associado com cisteamina 100 µM. CAT= oócitos submetidos à MIV com suplementação de 100 UI catalase. C + C + CAT = oócitos submetidos à MIV com suplementação de cisteína 0,6 mM associado com cisteamina 100 µM e 100 UI catalase. Barras com letras distintas diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P<0,05$).

A concentração intracelular de ROS (Figura 3) em oócitos bovinos, expressos em unidades arbitrárias de fluorescência, foram menores ($P<0,05$) nos grupos 0h

($1,00 \pm 0,12$), C+C ($1,11 \pm 0,04$) e C+C+CAT ($1,07 \pm 0,04$), porém não diferiram entre si ($P > 0,05$). As maiores concentrações de ROS foram encontradas no grupo Controle ($1,91 \pm 0,10$), que diferiu ($P < 0,05$) de todos os grupos mencionados e do grupo CAT ($1,45 \pm 0,08$).

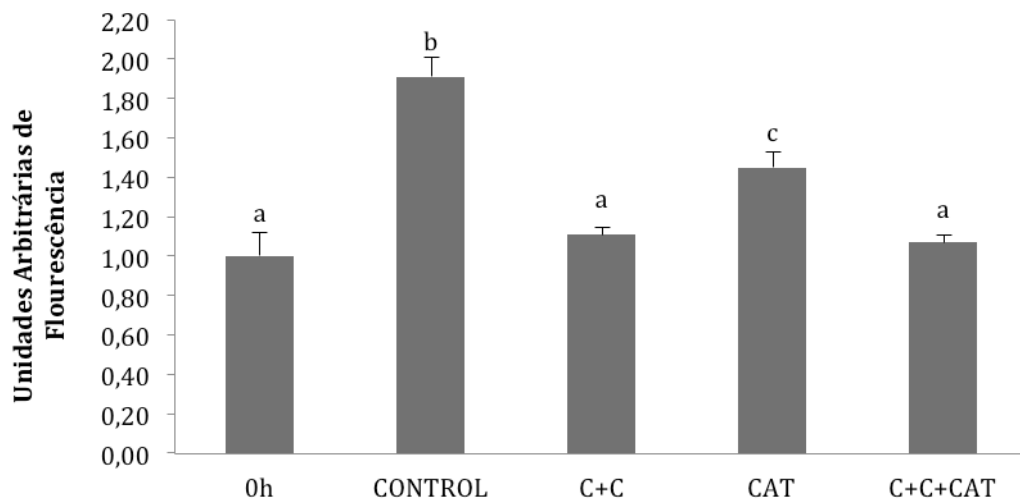


Figura 3. Concentrações intracelulares de ROS (quantificados em unidades arbitrárias de fluorescência) de oócitos maturados *in vitro* em meio suplementado ou não com antioxidantes. 0h = Oócitos imaturos. Controle = oócitos submetidos à MIV sem suplementação com antioxidantes. C + C = oócitos submetidos à MIV com suplementação de cisteína 0,6 mM associado com cisteamina 100 μ M. CAT = oócitos submetidos à MIV com suplementação de 100 UI catalase. C + C + CAT = oócitos submetidos à MIV com suplementação de cisteína 0,6 mM associado com cisteamina 100 μ M e 100 UI catalase. Barras com letras distintas diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

O potencial de membrana mitocondrial (Figura 4), também expresso em unidades arbitrárias de fluorescência, aumentou ($1,41 \pm 0,05$ a $1,81 \pm 0,07$) em todos os grupos ($P < 0,05$) comparados ao grupo 0h ($1,00 \pm 0,05$), com exceção do grupo C+C ($0,94 \pm 0,03$), que não diferiu ($P > 0,05$).

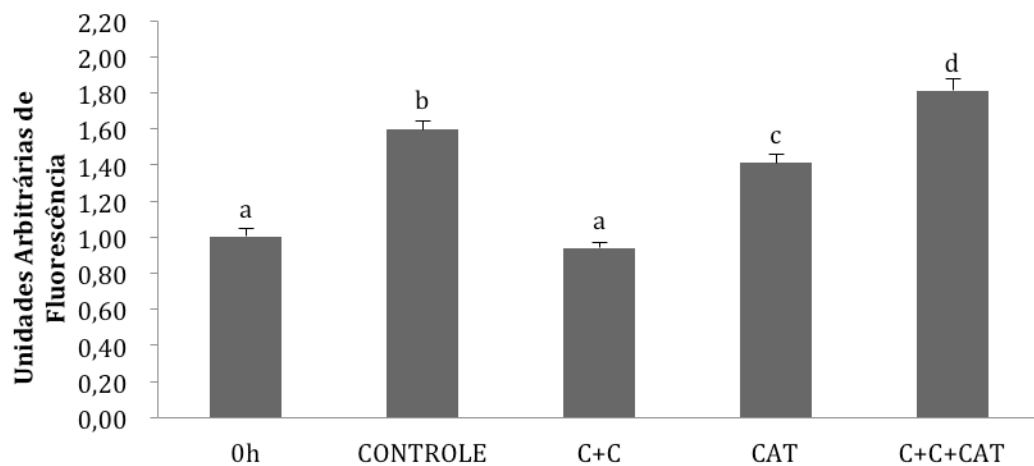


Figura 4. Potencial de membrana mitocondrial (quantificado em unidades arbitrárias de fluorescência) de oócitos maturados *in vitro* em meio suplementado ou não com antioxidantes. 0h = Oócitos imaturos. Controle = oócitos submetidos à MIV sem suplementação com antioxidantes. C + C = oócitos submetidos à MIV com suplementação de cisteína 0,6 mM associado com cisteamina 100 μ M. CAT= oócitos submetidos à MIV com suplementação de 100 UI catalase. C + C + CAT = oócitos submetidos à MIV com suplementação de cisteína 0,6 mM associado com cisteamina 100 μ M e 100 UI catalase. Barras com letras distintas diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os efeitos da suplementação com antioxidantes durante a MIV sobre as taxas de clivagem e blastocistos estão representados na Figura 5. Não houve efeito ($P > 0,05$) da suplementação com antioxidantes nas taxas de clivagem (72,5 a 75,4%). No entanto, o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos aumentou ($P < 0,05$) no grupo C+C+CAT (46,2%) comparado aos demais grupos (28,2 a 33,3%).

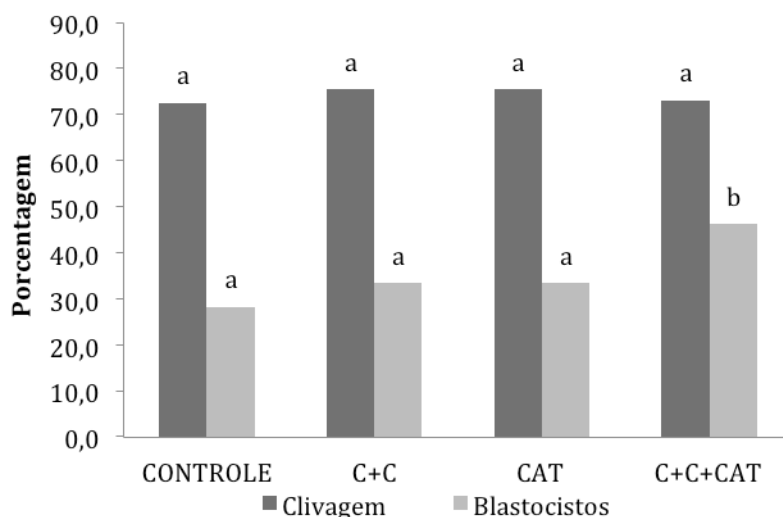


Figura 5. Efeito da suplementação com diferentes antioxidantes durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre as taxas de clivagem e desenvolvimento até a fase de blastocistos. Controle = oócitos submetidos à MIV sem suplementação com antioxidantes. C + C = oócitos submetidos à MIV com suplementação de cisteína 0,6 mM associado com cisteamina 100 μ M. CAT= oócitos submetidos à MIV com suplementação de 100 UI catalase. C + C + CAT = oócitos submetidos à MIV com suplementação de cisteína 0,6 mM associado com cisteamina 100 μ M e 100 UI catalase. Barras com letras distintas diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Neste estudo foram comparados os efeitos da suplementação com antioxidantes intracelulares e/ou extracelulares sobre o potencial de membrana mitocondrial e acúmulo intracelular de ROS e GSH entre oócitos bovinos imaturos (0h) e maturados cultivados em condições de cultivo padrão de MIV. Os principais resultados aqui relatados sugerem que: (1) as maiores concentrações intracelulares de ROS em oócitos maturados do grupo Controle em comparação aos oócitos imaturos indicam que as condições utilizadas para o cultivo de MIV pode gerar estresse oxidativo; (2) a suplementação do meio de MIV com C+C e C+C+CAT evita o aumento do acúmulo intracelular de ROS ao final da etapa de maturação assemelhando-se aos encontrados em oócitos imaturos; (3) com a exceção do grupo C+C, um aumento do potencial de membrana mitocondrial foi observado em oócitos maturados quando comparado aos oócitos imaturos, sugerindo um papel da função mitocondrial na competência oocitária; e (4) o aumento do potencial de

membrana mitocondrial em oócitos ao final da etapa de maturação foi associado a uma maior aquisição de competência para desenvolvimento, isto é, maior o desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Os efeitos da modulação do $\Delta\psi_m$ e os níveis intracelulares de ROS e GSH durante a MIV, na presença de antioxidantes intra- e extracelulares, foram investigados sobre a conclusão da meiose. Os resultados demonstraram que a porcentagem de oócitos que concluíram a maturação nuclear ao final da MIV não foi afetada pela suplementação com antioxidantes e a porcentagem de oócitos que atingiram o estágio de MII (76,7% - 80,5%) foi semelhante (MORADO *et al.*, 2009; CETICA *et al.*, 2001) ou superior (MEIYU *et al.*, 2014) àquelas reportadas na literatura. Relatos presentes da literatura indicam que o aumento da atividade mitocondrial é aparentemente necessário para permitir a maturação nuclear e conclusão da meiose II (DE VANTERY *et al.*, 1997; PICTON *et al.*, 1998; TARAZONA *et al.*, 2006). Além disso, em ambos os gametas (masculinos e femininos), a GSH está envolvida na proteção das células contra os danos decorrentes do estresse oxidativo e na manutenção da morfologia do fuso meiótico do oócito (LUBERDA *et al.*, 2005; MORADO *et al.*, 2009). Desta forma, como demonstrado neste estudo, os sistemas propostos para MIV forneceram condições satisfatórias (no meio extracelular e/ou intracelular) para permitir a conclusão da maturação nuclear em oócitos, bem como a aquisição de competência para o desenvolvimento embrionário subsequente até o estágio de blastocisto.

A proporção de oócitos TUNEL-positivo (oócitos em apoptose) do grupo C+C+CAT foi superior à encontrada no grupo MIV na presença de antioxidante extracelular (CAT). No entanto, essa porcentagem é inferior às observadas em diversos estudos; por exemplo, recentemente Meiyu *et al.* (2014) relataram que 30% dos oócitos apresentaram núcleo TUNEL-positivo após a etapa de maturação *in vitro*. A apoptose é um fenômeno fisiológico que ocorre com o propósito de eliminar células lesadas e é sabido que a deficiência na conclusão da maturação nuclear associada a um aumento da proporção de oócitos em apoptose ao final da MIV está correlacionada com a redução nas taxas de desenvolvimento embrionário (MEIYU *et al.*, 2014). No entanto, como demonstrado nesse estudo, os sistemas propostos para MIV permitiram que oócitos concluíssem a maturação nuclear e os achados de

porcentagem de apoptose são aceitáveis, não comprometendo a competência de oócitos para o desenvolvimento embrionário subsequente.

Com o objetivo de avaliar os efeitos do sistema de cultivo da MIV sobre a qualidade dos oócitos, alguns parâmetros específicos de maturação citoplasmática (os níveis intracelulares de GSH e de ROS e o $\Delta\psi_m$) foram comparados entre os oócitos maturados e recuperados imediatamente após a aspiração folicular (oócitos imaturos). Os níveis intracelulares de ROS aumentaram ao final da MV no grupo Controle comparado aos oócitos imaturos. Durante a MIV, a formação de determinados níveis de ROS pode aumentar a aquisição de competência de oócitos para o desenvolvimento embrionário, sugerindo que as ROS podem desempenhar diferentes papéis, dependendo do momento e da quantidade que estão presentes ao longo do cultivo de oócitos bovinos (BLONDIN *et al.*, 1997). No entanto, o equilíbrio entre a produção de ROS e os mecanismos de defesa celular antioxidante é essencial para o cultivo *in vitro*, caso contrário, o estresse oxidativo pode resultar em danos celulares, particularmente por perturbar a membrana mitocondrial, o que pode culminar em apoptose e falha no desenvolvimento embrionário (TRVDÁ *et al.*, 2011). Assim, verificou-se que os níveis intracelulares de ROS em oócitos maturados na presença de antioxidantes intracelulares (grupos C+C e C+C+CAT) foram mantidos baixos como os níveis observados em oócitos imaturos, porém o mesmo não foi observado em oócitos maturados na presença do antioxidante extracelular (grupo CAT). No entanto, ao final da maturação, os níveis intracelulares de ROS no grupo CAT foram menores quando comparados ao grupo Controle. Estes efeitos eram esperados e são decorrentes da ação da catalase na remoção do H_2O_2 produzida no meio extracelular (ou seja, no meio de cultivo), enquanto que os antioxidantes intracelulares (cisteína associada à cisteamina) atuam na remoção das ROS intracelulares, produzidas pelos oócitos e células do cumulus em resposta à utilização do oxigênio para produção de energia através da fosforilação oxidativa mitocondrial (DELEUZE & GOUDET, 2010, ROCHA-FRIGONI *et al.*, 2014). Desta forma, o efeito esperado era uma redução nos efeitos deletérios decorrentes da ação do H_2O_2 e de outras ROS (GUÉRIN *et al.*, 2001), tais como as modificações oxidativas de componentes celulares, como o DNA, lipídios e proteínas (DELEUZE & GOUDET, 2010). Curiosamente, a utilização da catalase parece ser uma

estratégia que permite a produção de níveis intracelulares intermediários de ROS ao final da maturação, uma vez que evidências indicam que as ROS podem regular a função celular controlando a produção e a ativação de substâncias que têm atividade biológica nas principais vias de sinalização celular (BUHIMSCHI *et al.*, 2000; MARSHALL *et al.*, 2000; MORADO *et al.*, 2009). Assim, a catalase pode atuar como antioxidante reduzindo os elevados níveis de ROS sem comprometer as funções celulares envolvidas em processos fisiológicos dependentes do equilíbrio redox.

A síntese intracelular de GSH é fundamental na maturação citoplasmática oocitária (EPPIG *et al.*, 1996) e elevados níveis de GSH no final da etapa de maturação são considerados bons marcadores bioquímicos para a qualidade de oócitos (DE MATOS *et al.*, 1995) visto que atuam como reservatório para proteção contra danos oxidativos em zigotos e embriões anteriormente à transição materno-zigótica e síntese *de novo* de GSH (DELEUZE & GOUDET, 2010). No entanto, os resultados do presente estudo demonstraram uma diminuição nos níveis intracelulares de GSH em oócitos maturados de todos os grupos quando comparados com os oócitos imaturos (0h). Isso possivelmente ocorreu devido às condições de incubação, que podem promover maior mobilização e utilização do GSH visando a neutralização da contínua e elevada produção de ROS pelas células e pelo meio de cultivo (LIVINGSTON *et al.*, 2009; CURNOW *et al.*, 2008; CETICA *et al.*, 2001). Interessantemente, a comparação entre os oócitos maturados *in vitro* revelaram uma redução menos acentuada dos estoques intracelulares de GSH comparado aos oócitos maturados na presença de cisteína e cisteamina (grupo C+C), que são precursores para a síntese de glutathione reduzida. Assim, uma vez que a síntese intracelular de GSH foi estimulada por estes compostos tiols, o esgotamento dos níveis de GSH no final de MIV foi inferior. Por outro lado, a adição da catalase não atenuou a diminuição nos níveis de GSH em oócitos maturados *in vitro*, uma vez que este antioxidante extracelular enzimático não estimula a síntese *de novo* de GSH. A catalase é incapaz de atravessar a membrana plasmática, de modo que este antioxidante não atua na remoção do H₂O₂ produzido pela célula (KOURIDAKIS & GARDNER 1995; ROCHA-FRIGONI *et al.*, 2014) então atua modulando as ROS produzidas pelo próprio meio de cultivo. No entanto, a

suplementação do meio de MIV com ambos antioxidantes avaliadas neste estudo (intra- e extracelular) foram eficientes para evitar o estresse oxidativo, uma vez que protegeram os oócitos contra os danos decorrentes dos elevados níveis de ROS.

Embora a depleção dos níveis intracelulares de GSH nos oócitos maturados na presença de antioxidantes intracelulares (Grupo C+C) tenha sido menor, contrariamente ao esperado o mesmo não foi observado quando oócitos foram maturados com uma combinação de antioxidantes intra- e extracelulares (grupo C+C+CAT). No entanto, os oócitos deste grupo apresentaram elevado $\Delta\psi_m$ ao final da etapa de maturação e, sabe-se que o aumento da atividade mitocondrial em oócitos leva a um aumento na troca de elétrons na membrana mitocondrial interna, que é considerado como um das principais fontes de ROS (ZHAO *et al.*, 2011). Logo, em condição de elevado $\Delta\psi_m$, espera-se que a produção de ROS seja elevada, mas no entanto os níveis intracelulares de ROS em oócitos maturados do grupos C+C+CAT foi similar ao grupo C+C (apenas antioxidantes intracelulares) e menor do que o grupo CAT (apenas antioxidante extracelular), sugerindo que a GSH tenha sido consumida, a fim de evitar os efeitos deletérios dos elevados níveis de ROS (DELEUZE & GOUDET, 2010). Desta forma, os resultados aqui apresentados indicam que o estresse oxidativo induzido por ambas as reações metabólicas intracelulares e pelo meio extracelular devem ser consideradas no estudo do metabolismo redox em células sob condições de incubação *in vitro*.

O conceito de competência oocitária ainda não está completamente elucidado (DURANTHON E RENARD, 2001), mas a mitocôndria pode desempenhar papel importante na aquisição de competência (CUMMINS *et al.*, 2004), uma vez que o estado metabólico mitocondrial, baseado no $\Delta\psi_m$ e conteúdo de ATP, pode ser associado à qualidade oocitária. Com exceção do grupo C+C, os resultados obtidos neste estudo demonstraram que oócitos imaturos apresentaram menor $\Delta\psi_m$ comparado com oócitos maturados *in vitro*. Estudos anteriores também demonstraram que poucos oócitos imaturos possuem atividade mitocondrial, provavelmente porque a maioria das mitocôndrias ainda são imaturas; no entanto após a etapa de maturação, a atividade mitocondrial em oócitos aumenta e a sua distribuição torna-se difusa pelo citoplasma (STOJKOVIC *et al.*, 2001; WILDING *et al.*, 2001; TAMASSIA *et al.*, 2004). De acordo com Tarazona *et al.* (2006), o aumento

do $\Delta\psi_m$ é aparentemente necessário para suportar outros eventos da maturação que são dependentes da produção de ATP, tais como a maturação nuclear e a conclusão da MII (DE VANTERY *et al.*, 1997; PICTON *et al.*, 1998), maturação citoplasmática (PICTON *et al.*, 1998), reorganização do citoesqueleto (WANG E LESSMAN, 2002; VAN BLERKOM *et al.*, 2000), bem como o acúmulo de transcritos necessários para suportarem o desenvolvimento inicial antes da ativação do genoma embrionário (PICTON *et al.*, 1998; GARY 2001; TROUNSON *et al.*, 2001). Já a produção inadequada de ATP irá resultar em bloqueio do desenvolvimento, uma vez que são necessárias quantidades suficientes de ATP para inúmeros eventos celulares após a fecundação, incluindo a organização dos microtúbulos, regulação do ciclo celular, a segregação dos cromossomos e reestruturação da membrana plasmática (TORNER, 2008; BENTOV, 2011). Assim, é evidente que as mitocôndrias devem fornecer quantidades adequadas de ATP para suportar os primeiros dias do desenvolvimento embrionário (THOUAS, 2005; LIN, 2004), uma vez que a replicação do DNA mitocondrial (DNAm) e proliferação mitocondrial não ocorre até o estágio de blastocisto (THUNDATHIL, 2005), mas sabe-se que as vias metabólicas aeróbica e anaeróbica atuam conjuntamente visando atender às necessidades energéticas inerentes ao embrião nos estágios iniciais (CHAPPEL, 2013). Como o conteúdo de ATP não foi avaliado nesse estudo, não podemos correlacionar o baixo $\Delta\psi_m$ com baixo suprimento de energia em oócitos do grupo C+C, mas podemos supor que os níveis de ATP não estavam abaixo do nível mínimo permitido, porque alguns desses eventos ATP-dependentes, como a conclusão da MII e o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, foram devidamente concluídos neste estudo.

Por outro lado, observou-se que o aumento do potencial de membrana mitocondrial encontrado em oócitos maturados na presença da associação de antioxidantes intra- e extracelulares (C+C+CAT) refletiu em aumento do desenvolvimento embrionário *in vitro*. Assim, os resultados do presente estudo demonstraram que a utilização de apenas um único parâmetro de avaliação da qualidade dos oócitos não é adequado para prever a aquisição de competência para o desenvolvimento embrionário. No entanto, a avaliação simultânea de diferentes parâmetros de qualidade oocitária pode indicar, com maior confiabilidade, a melhor

condição de incubação a ser estabelecida durante a MIV de oócitos bovinos. Baseado nisso, verificou-se que os oócitos maturados em meio suplementado com uma combinação de cisteína, cisteamina e catalase não apresentaram as maiores concentrações de GSH ao final de etapa de MIV, que é considerado como um bom marcador bioquímico para a qualidade do oócito (DE MATOS *et al.*, 1995), no entanto tais oócitos demonstraram aumento significativo do potencial da membrana mitocondrial, que pode resultar em aumento da produção de ATP, o que reflete em melhoria da competência oocitária para o desenvolvimento embrionário subsequente (STOJKOVIC *et al.*, 2001).

5. CONCLUSÃO

A suplementação com antioxidantes intra- (cisteína e cisteamina) e extracelular (catalase) aumentou o potencial de membrana mitocondrial e reduziu o acúmulo intracelular de ROS, o que refletiu em melhoria da competência oocitária para o desenvolvimento embrionário subsequente.

REFERÊNCIAS

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

BAIN, N.T.; MADAN, P.; BETTS, D.H. The early embryo to intracellular reactive oxygen species is developmentally regulated. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.23, p.561-575, 2011.

BENTOV, Y.; YAVORSKA, T.; ESFANDIARI, N.; JURISICOVA, A.; CASPER R.F. The contribution of mitochondrial function to reproductive aging. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.28, p.773-783, 2011.

BERHMAN, H.R.; KODAMAN, P.H.; PRESTON, S.L.; GAO, S. Oxidative stress on the ovary. **J. Soc. Gynecol. Investig.**, v.8, p.40-42, 2011.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; SIRARD, M.A. The Impact of Reactive Oxygen Species on Bovine Sperm Fertilizing Ability and Oocyte Maturation. **Journal of Andrology**, v.18, p.454-460, 1997.

BUHIMSCHI, I.A.; KRAMER, W.B.; BUHIMSCHI, C.S.; THOMPSON, L.P.; WEINER C.P. Reduction-oxidation (redox) state regulation of matrix metalloproteinase activity in human fetal membranes. **Am. J. Obstet, Gynecol.**, v.182, p.458-464, 2000.

CETICA, P.D.; PINTOS, L.N.; DALVIT, G. C.; BECONI, M.T. Antioxidant Enzyme Activity and Oxidative Stress in Bovine oocyte In Vitro Maturation. **IUBMB Life**, v.51, p.57-64, 2001.

CHAPPEL, S. The role of mitochondria from mature oocyte to viable blastocyst. **Obstetrics and Gynecology International**, v. 2013, p.1-10, 2013.

CORRÊA, G.A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T.C.D.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A.N. Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Anim. Reprod. Sci.**, v.104, p.132-42, 2008.

CURNOW, E.C.; RYAN, J.; SAUNDERS, D.; HAYES, E.S. Bovine in vitro oocyte maturation as a model for manipulation of the γ - glutamyl cycle and intraoocyte glutathione. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 20, p.579-588, 2008.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F.; BALDASSARE, H. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocytes matured in vitro. **Mol. Reprod. Dev.**, v.42, p.432-438, 1995.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C. The importance of having high glutathione (GSH) levels after bovine in vitro maturation on embryo development: effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology**, v.53, p. 761-842, 2000.

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

DE VANTERY, C.; STUTZ, A.; VASSALI, J.D.; SCHODERET-SLATKINE S. Acquisition of meiotic competence in growing mouse is controlled at both translational and posttranslational levels. **Dev. Biol.**, v.187, p.43-54, 1997.

DURANTHON, V.; RENARD J. The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. **Theriogenology**; v. 55, p.1277-1289, 2001.

EPPIG, J.J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. **Reprod, Fertil. Dev.**; v.8; p.485-489, 1996.

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 prooxidants agents. **Theriogenology**, v.63, p.71-90, 2004.

GARY, D.S. In vitro maturation of oocytes. **Curr. Women's Health Rep.**, v.1, p.143-151, 2001.

GONÇALVES F.S.; BARRETO L.S.S.; ARRUDA R.P.; PERRI S.H.V.; MINGOTI G.Z. Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. **Reprod. Domest. Anim.**, v.45, p.129-135, 2010.

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

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

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

KOURIDAKIS, K.; GARDNER, D.K. Pyruvate in embryo culture media acts as an antioxidant. **Proc. Fertile. Soc. Aus.**, v.4: p. 29, 1995.

LASH LH. Mitochondrial glutathione transport: physiological, pathological and toxicological implications. **Chem Biol Interact.**, v.163, p.54-67, 2006.

LIN, D.P.C.; HUANG, C.C.; WU, H.M.; CHENG, T.C.; CHEN, C.I.; LEE, M.S. Comparison of mitochondrial DNA contents in human embryos with good or poor morphology at the 8-cell stage. **Fertility and Sterility**, v.81, p.73-79, 2004.

LIVINGSTON, T.; RICH, K.; MACKENSIE, S.; GODKIN, J.D. Glutathione ontent and antioxidant enzyme expression of in vivo matured sheep oocytes. **Anim. Reprod. Sci.**, v.116, p.265-273, 2009.

LUBERDA Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reprod. Biol.**, v.5, p.5-17, 2005.

MARSHALL, H.E.; MERCHANT, K.; STAMLER, J.S. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. **FASEB J.**, v.14, p.1889-1900, 2000.

MARTÍN-ROMERO, F.J.; MIGUEL-LASOBRAS, E.M.; DOMÍNGUEZ-ARROYO, J.A.; GONZÁLEZ-CARRERA, E.; ÁLVAREZ, I.S. Contribution of culture media to oxidative stress and its effects on human oocytes. **Reprod. Biomed. Online**, v.17, p.652-661, 2008.

MINGOTI G.Z.; CAIADO CASTRO V.S.; MÉO S.C.; BARRETTO L.S.; GARCIA J.M. The effect of interaction between macromolecule supplement and oxygen tension on bovine oocytes and embryos cultured in vitro. **Zygote**, v.17, n. 4, p.321-328, 2009.

MINGOTI G.Z.; CASTRO V.S.; MÉO S.C.; SÁ BARRETTO L.S.; GARCIA J.M. The effects of macromolecular and serum supplements and oxygen tension during bovine in vitro procedures on kinetics of oocyte maturation and embryo development. **In Vitro Cell Dev Biol Anim.**, v.47, n.5-6, p.361-367, 2011.

MEIYU, Q.; LIU, D.; ROTH, Z. IGF-1 slightly improves nuclear maturation and cleavage rate of bovine oocytes exposed to acute heat shock in vitro. **Zygote**, v.29, p.1-11, 2014.

MORADO, S.A.; CETICA, P.D.; BECONI, M.T.; DALVIT, G.C. Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.21, p.608-614, 2009.

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

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M.A.; FIRST, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biol. Reprod.**, v.38, p.1171-1188, 1988.

PICTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Mol. Cell Endocrinol.**, v.145, p. 27-37, 1998.

PIERCE, J.D.; CACKLER, A.B.; ARNETT, M.G. Why should you care about free radicals? **RN**, v.67, p.38-42, 2004.

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

ROCHA-FRIGONI, N.A.; LEÃO, B.C.; NOGUEIRA, É.; MINGOTI, G.Z. Effect of gaseous atmosphere and antioxidants on the development and cryotolerance of bovine embryos at different periods of in vitro culture. **Zygote**, v.23, p.159-168, 2015.

SCHEFFLER I. Mitochondria. **J.Wiley and Sons**, New York, p. 364.

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

TAMASSIA, M.; NUTTINCK, F.; MAY-PANLOUP, P. In vitro embryo production efficiency in cattle and its association with oocyte adenosine triphosphate content, quantity of mitochondrial DNA, and mitochondrial DNA haplogroup. **Biology of Reproduction**, v.71, p.697-704, 2004.

TARAZONA, A.M.; RODRIGUEZ, J.I.; RESTREPO, L.F.; OLIVERA-ANGEL M. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro. **Reprod. Dom. Anim.**, v.41, p.5-11, 2006.

THOUAS, G.A.; TROUNSON, A.O.; JONES, G.M. Effect of female age on mouse oocyte developmental competence following mitochondrial injury. **Biology of Reproduction**, v.73, p. 366-373, 2005.

THUNDATHIL, J.; FILION, F.; SMITH LAWRENCE, C. Molecular control of mitochondrial function in preimplantation mouse embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v.71, p.405-413, 2005.

TORNER, H.; GHANEM, N.; AMBROS, C. Molecular and subcellular characterization of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Reproduction**, v. 135, p. 197-212, 2008.

TROUNSON, A.; ANDERIESZ, C.; JONES, G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. **Reproduction**, v.121, p.51-75, 2001.

TVRDÁ, E.; KNAZICKÁ, Z.; BÁRDOS, L.; MASSÁNYI, P.; LUKÁC, N. Impact of oxidative stress on male fertility – a review. **Acta Vet. Hung.**, v.59, p.465-484, 2011.

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

VAN BLERKOM, J.; DAVIS, P.; ALEXANDER, S. Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres relationship to microtubular organization, ATP content and competence. **Human Reproduction**, v.15, p.2621-2633, 2000.

WANG, T.; LESSMAN, C.A. Isoforms of soluble alpha-tubulin in oocytes and brain of the frog (genus *Rana*): changes during oocyte maturation. **Cell. Mol. Life**, v.59, p. 2216-2223, 2002.

WILDING, M.; DALE, B.; MARINO, M.; DI MATTEO, L.; ALVIGGI, G.P.; ISARUTO, M.L.; LOMBARDI, L.; DE PLACIDO, G. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. **Hum. Reprod.**, v.16, p.909-917, 2001.

YUAN, Y.Q.; VAN SOOM, A.; LEROY, J.L.M.R.; DEWULF, J.; VAN ZEREVEN, A.; DE KRUIF, A.; PEELMAN, L.J. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. **Theriogenology**, v.63, p.2147-2163, 2005.

ZHAO, X.; DU, W.; WANG, D.; HAO, H.; LIU, Y.; QIN, T.; ZHU, H. Recovery of Mitochondrial Function and Endogenous Antioxidant Systems in Vitrified Bovine Oocytes During Extended In Vitro Culture. **Mol. Reprod. Dev.**, v.78, p.942-950, 2011.

CAPÍTULO 3 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTE DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* SOBRE A QUALIDADE E DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS EM CONDIÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO

RESUMO – O objetivo deste estudo foi avaliar se a suplementação do meio de MIV com antioxidantes intracelulares e extracelulares (cisteína, cisteamina e catalase; ATX) é capaz de minimizar os efeitos deletérios do estresse oxidativo induzido durante o CIV através da avaliação da concentração intracelular de ROS e de glutathiona (GSH), atividade de caspases, ocorrência de apoptose, bem como o desenvolvimento embrionário subsequente, como se segue: 1) MIV + CIV na ausência de menadiona (Controle); 2) MIV ATX + CIV (Controle ATX); 3) MIV + CIV na presença de menadiona (MD); 4) MIV ATX + CIV na presença de menadiona (ATX MD). A concentração intracelular de GSH foi similar ($P>0,05$) entre os grupos (18,0 a 21,1). O acúmulo intracelular de ROS encontrado no grupo MD (21,7) foi superior ($P<0,05$) aos observados nos grupos Controle (17,0) e Controle ATX (17,5), já o grupo ATX MD (19,0) não diferiu ($P>0,05$) dos grupos anteriormente mencionados. Com relação à atividade de caspases não houve diferença ($P>0,05$) entre os grupos (33,7 a 40,8). No entanto, as porcentagens de apoptose encontradas nos grupos MD (22,4%) e ATX MD (22,3%) foram superiores ($P<0,05$) comparadas aos grupos Controle (12,8%) e Controle ATX (9,4%). O desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto foi menor ($P<0,05$) no grupo MD (21,30%) comparados aos grupos Controle (35,4%) e Controle ATX (34,5%), porém o grupo ATX MD (28,3%) não diferiu ($P>0,05$) dos demais grupos. Em conclusão, a suplementação com antioxidantes durante a MIV minimizou os efeitos deletérios decorrentes da condição de estresse oxidativo, induzido pela MD durante o CIV, sobre os níveis intracelulares de ROS e desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos.

Palavras-chave: competência oocitária, menadiona, bovino

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento embrionário *in vitro* é afetado primariamente pela qualidade oocitária (FUKUI & OYAMADA, 2004). O ambiente de cultivo aos quais os gametas e embriões são expostos também podem comprometer a qualidade e a produção *in vitro* de embriões, principalmente em situações que estimulem o aumento expressivo da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Sob condições fisiológicas, as ROS são produzidas por oócitos, embriões e pelas células do cumulus durante o metabolismo aeróbico, mais especificamente durante a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, como resultado da reação de transferência de elétrons para a molécula de oxigênio (FEUGANG *et al.*, 2004). No entanto, as condições de incubação adotadas nos sistemas de PIV podem gerar uma condição de estresse oxidativo, dentre as quais pode-se citar a própria composição dos meios de cultivo, a suplementação com macromoléculas e outras substâncias que compõem os meios, ou mesmo as tensões suprafisiológicas de oxigênio (~20%) que são rotineiramente utilizadas nos sistemas de PIV (CÔRREA *et al.*, 2008; MINGOTI *et al.*, 2009; MARTÍN-ROMERO 2010). O desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes (NABENISHI *et al.*, 2011) no cultivo podem levar à instalação do processo denominado estresse oxidativo, que resulta em perturbações de processos regulados por reações de redução-oxidação (redox) e culmina em danos celulares, tais como a peroxidação lipídica, oxidação de aminoácidos e ácidos nucleicos (GUÉRIN *et al.*, 2001; BAIN *et al.*, 2011; KITAGAWA *et al.*, 2004) e bloqueio do desenvolvimento embrionário *in vitro* (FUKUI & OYAMADA, 2004). Mais especificamente, elevados níveis de ROS podem causar danos no DNA, em decorrência da ruptura das membranas mitocondriais com a consequente liberação de citocromo C e a ativação da cascata de caspases, culminando em apoptose e falha do desenvolvimento embrionário (TRVDÁ *et al.*, 2011). No entanto, embora elevadas concentrações de ROS possam ser deletérias, elas atuam como moléculas sinalizadoras e podem influenciar diversas funções celulares quando presentes em concentrações fisiológicas como, por exemplo, a produção de energia e proliferação celular no desenvolvimento inicial de embriões, diferenciação celular e expressão

gênica (UFER *et al.*, 2010). Desta forma, a modulação da produção intra- e extracelular de ROS é uma das chaves para o aprimoramento do desenvolvimento embrionário *in vitro* (TAKAHASHI *et al.*, 2012).

Para que haja um equilíbrio na concentração de ROS produzidas pelos oócitos no ambiente folicular, especialmente durante o processo de ovulação, o fluido folicular e as células do cumulus possuem diferentes tipos de agentes antioxidantes, seja de ação enzimática (superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase) ou não enzimática (glutathione, ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno) que atuam neutralizando as ROS produzidas *in vivo* (MORADO *et al.* 2009). Por outro lado, na condição *in vitro*, os gametas e embriões são incubados em meios de cultivo que, por sua vez, representam uma importante fonte de ROS nas técnicas de reprodução assistida (MARTÍN-ROMERO 2010). Neste contexto, o acúmulo de ROS e o estresse oxidativo levam ao envelhecimento e deterioração da qualidade do oócito e das células da granulosa (TAMURA *et al.* 2012), o que compromete a competência oocitária para o desenvolvimento *in vitro*.

Atualmente, mais atenção têm sido dada à suplementação do meio de MIV com compostos de tiol, tais como cisteína ou cistina (DE MATOS *et al.*, 2000) e cisteamina (DELEUZE & GOUDET, 2010), que podem aumentar os níveis intracelulares de glutathione (GSH) em oócitos bovinos. O GSH atua como o principal sistema de defesa não enzimática em oócitos e embriões para promover a desintoxicação de peróxidos lipídicos e proteínas tioladas e a remoção do H_2O_2 (JOHNSON *et al.*, 1994). A biossíntese da GSH é limitada pela disponibilidade de cisteína no meio de cultivo, no entanto, esta substância é instável fora da célula e, provavelmente, pouca cisteína esteja presente no meio de cultivo devido à sua auto-oxidação em cistina (CURNOW *et al.*, 2008). Os compostos de tiol de baixo peso molecular, tais como a cisteamina e β -mercaptoetanol, promovem a redução de cistina em cisteína, aumentando a captação de cisteína e a síntese de GSH (DELEUZE & GOUDET, 2010).

Os antioxidantes de ação enzimática extracelular tem sido menos estudados, todavia foi recentemente demonstrado que a adição de catalase durante a PIV reduziu os níveis intracelulares de ROS e a taxa de apoptose em embriões bovinos (ROCHA-FRIGONI *et al.*, 2014). Este achado estimula a proposição de novos

estudos para investigar a modulação da produção extracelular de ROS, visando melhorar o sistema de PIV. Ainda, não há relatos da suplementação com antioxidantes intra- e extracelulares associados durante a MIV sobre a competência oocitária para o desenvolvimento embrionário subsequente.

Dada a constante ameaça à viabilidade celular imposta pela ação das ROS, vários estudos tem focado a atenção na utilização de substâncias antioxidantes em sistemas de PIV. A utilização de compostos que induzam um aumento expressivo na produção de ROS, como a menadiona, pode ser uma ferramenta interessante em estudos sistematizados sobre os danos deletérios decorrentes do estresse oxidativo. A menadiona, ou vitamina k_3 , é uma naftoquinona utilizada como fonte de vitaminas na nutrição animal (MOSS *et al.*, 2009). Na presença de oxigênio, esta substância induz a geração de O_2^- , H_2O_2 e outras ROS (MONKS *et al.*, 1992), resultando em apoptose (MOSS *et al.*, 2009). Desta forma, a utilização da menadiona como geradora de estresse oxidativo em sistemas de PIV pode ser um modelo interessante para a avaliação do efeito protetor ou promotor de sobrevivência de drogas específicas, tais como antioxidantes extra ou intracelulares.

Os efeitos da suplementação com antioxidantes durante a MIV já foram bem documentados, no entanto os efeitos dessa suplementação sobre a aquisição de resistência aos danos decorrentes do estresse oxidativo durante o desenvolvimento embrionário nunca foi descrita. Desta forma, o presente estudo foi delineado para testar a hipótese de que a suplementação com antioxidantes durante a etapa de maturação *in vitro* é capaz de minimizar os efeitos deletérios do estresse oxidativo induzido pela menadiona sobre o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos. Portanto, neste estudo foi avaliado se: (1) a adição de 5 μ M de MD durante o cultivo *in vitro* gera estresse oxidativo; (2) a suplementação do meio de MIV com associação de antioxidantes intracelulares e extracelulares (cisteína, cisteamina e catalase) é capaz de minimizar os efeitos deletérios do estresse oxidativo induzido durante o CIV, avaliando-se especificamente os níveis intracelulares de ROS e de glutathiona (GSH), atividade de caspases e ocorrência de apoptose, bem como o desenvolvimento embrionário subsequente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes químicos

Os reagentes utilizados foram da empresa Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), caso contrário estão especificados no texto. Todos os reagentes são testados pra cultivo celular. O meio de MIV utilizado foi o TCM-199 (Gibco, Invitrogen Co., Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Invitrogen Co.), 0,2 mM de piruvato, 25 mM de bicarbonato de sódio, 50 µg/mL de amicacina, 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin-V, Bionique Animal Health, Ontario, Canadá) e 100 UI/mL de hCG (Vetecor, Hertape Calier). O meio de fertilização utilizado foi o *Tyrode's albumin lactate pyruvate* (TALP), previamente descrito (PARRISH *et al.*, 1988), contendo 0,2 mM de piruvato, 13 mM de lactato de sódio, 50 µg/mL de amicacina e 40 µL/mL de solução de PHE (20 µM de penicilamina, 10 µM hipotaurina, e 2 µM epinefrina), 10 µg/mL heparina e 6 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) livre de ácidos graxos. Materiais plásticos e tubos foram obtidos da empresa Corning Inc. (Acton, MA, USA). O meio de cultivo embrionário utilizado foi o *Synthetic Oviduct Fluid* (SOF) modificado, previamente descrito (VAJTA *et al.*, 1999) suplementado com 0,2 mM de L-glutamina, 0,34 mM de citrato de sódio, 2,8 mM de myo-inositol, 2% de BME aminoácidos essenciais, 1% MEM aminoácidos não essenciais, 50 µg/mL de amicacina, 5 mg/mL de BSA e 2,5% (v/v) de SFB.

Obtenção de oócitos e maturação *in vitro*

Ovários de vacas abatidas em frigoríficos foram transportados até o laboratório a uma temperatura entre 30-35°C. Complexos *cumulus*-oócitos (COCs) foram aspirados de folículos antrais (3-8 mm de diâmetro), com seringa acoplada a uma agulha 18-G. O material aspirado foi transferido para tubos de 50 mL e decantado por 15 minutos e somente oócitos circundados com pelo menos quatro camadas de células do *cumulus* compactas e com citoplasma contendo granulação homogênea foram selecionados para o cultivo de maturação. Os COCs selecionados foram lavados e cultivados em meio de maturação TCM-199 com ou

sem a suplementação com antioxidantes, como se segue: 0,6 mM de cisteína associado a 100 μ M de cisteamina e 100 UI de catalase (ATX); ou sem a suplementação com antioxidantes (Controle). Foram transferidas 50 estruturas para cada poço da placa de cultivo de 4 poços (NUNC®, Nunclon Delta Treated 4-well IVF Dish, Denmark), contendo 500 μ L de meio de maturação (as diferenças entre os grupos estão descritas no delineamento experimental). O cultivo de maturação foi realizado em atmosfera de 5% CO₂ em ar e com máxima umidade, durante 22 horas.

Separação espermática e fertilização *in vitro*

Ao término da MIV, os oócitos foram submetidos à fecundação utilizando sêmen de um único touro Nelore (*Bos indicus*) da mesma partida e com fertilidade comprovada para produção *in vitro*. As palhetas foram descongeladas à temperatura de 36°C por 40 segundos e os espermatozoides móveis foram selecionados e separados do diluidor por centrifugação em gradiente de densidade descontínua de Percoll (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) em duas fases (250 μ L de Percoll 45% sobre 250 μ L de Percoll 90%, em microtubo de 1,5 mL) a 2500xg por 7 minutos. O sedimento recuperado foi avaliado quando ao volume, concentração e motilidade espermática. A concentração espermática utilizada foi 2×10^6 espermatozoides/mL de meio de fertilização. Foram adicionados 25 oócitos/gota, onde permaneceram em atmosfera de 5% de CO₂ em ar a 38,5°C durante 18-22 horas. O dia da fertilização foi considerado como Dia 0.

Cultivo embrionário *in vitro*

Após a fertilização os prováveis zigotos foram transferidos para o meio de CIV e cultivados em monocamada de células do cumulus. O cultivo foi realizado em poços de placas de cultivo de 4 poços (NUNC®, Nunclon Delta Treated 4-well IVF Dish, Denmark) contendo 500 μ L de meio SOF suplementado 0,5% de BSA e 2,5% de SFB em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ em ar e temperatura de 38,5°C por até sete dias.

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

avaliado às 168 hpi (Dia 7). Do Dia 6 até o final do CIV os embriões foram cultivados em meio SOF na presença ou ausência de 5 μ M de menadiona.

Mensuração do conteúdo intracelular de GSH reduzida

O conteúdo intracelular de GSH reduzida foram quantificados através da utilização da sonda fluorescente ThiolTracker™ Violet (Glutathione Detection Reagent; Molecular probes, Invitrogen, Oregon, USA) de acordo com as informações do fabricante. Resumidamente, os embriões foram desnudados e lavados duas vezes em PBS e, posteriormente, incubados em 20 μ M de ThiolTracker™ Violet durante 30 minutos no escuro, a 37,0°C em 5% de CO₂ em ar. Posteriormente, foram lavados duas vezes em PBS e foram avaliados imediatamente em microscópio invertido equipado com epifluorescência (Olympus, IX51), sob excitação de 404 nm e emissão de 526 nm. As imagens foram fotografadas e analisadas pelo programa Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc., Version 5.0.1.26) para quantificação da intensidade de fluorescência emitida (pixels). A intensidade do sinal de "background" foi subtraída dos valores medidos das imagens. Imagens representativas desta coloração podem ser observadas na Figura 1.

Mensuração do conteúdo intracelular de ROS pelo ensaio com diclorofluoresceína

O conteúdo intracelular de ROS (H₂O₂, HO•, ROO•) foram quantificados através da sonda fluorescente diacetato de 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA; Molecular Probes), como descrito por Bain *et al.* (2011). O procedimento foi realizado nos embriões após a remoção das células do cumulus. Os embriões foram lavados duas vezes em PBS e incubados em 5 μ M de H₂DCFDA durante 30 minutos, no escuro, a 38,5°C e 5% de CO₂ em ar. Posteriormente, foram lavados duas vezes em PBS e avaliados imediatamente em microscópio invertido equipado com epifluorescência (Olympus IX51; excitação de 495 nm e emissão de 520 nm). As imagens obtidas foram posteriormente analisadas pelo programa Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc. Version 5.0.1.26) para quantificação da intensidade de fluorescência emitida (Figura 4), mensurada em pixels. A intensidade do sinal de "background" foi subtraída dos valores medidos das imagens. Quanto

maior a intensidade de fluorescência, maior o conteúdo intracelular de ROS (Figura 1).

Mensuração da atividade das caspases 3 e 7

A mensuração da atividade das caspase 3 e 7 foi realizada em blastocistos expandidos utilizando um inibidor fluorescente enzimático (FLICA), que reage covalentemente com as caspases ativas emitindo fluorescência. O ensaio foi realizado com a sonda fluorescente “Image iT LIVE Red Caspase-3 and-7 Detection Kit” (Molecular Probes, Invitrogen, OR, USA), de acordo com as informações do fabricante. Brevemente, os embriões foram incubadas em 10 µL da solução 30 X FLICA em câmara úmida a 37 C por 1 hora, no escuro. Em seguida, foram lavados na solução 1 X *buffer* e fixados em paraformaldeído 4% por 40 minutos. Foram montadas as lâminas com glicerol e os embriões corados foram avaliados imediatamente em microscópio invertido equipado com epifluorescência (Olympus, IX51), sob excitação de 550 nm e emissão de 595 nm. As imagens foram fotografadas e analisadas pelo programa Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc., Version 5.0.1.26) para quantificação da intensidade de fluorescência emitida (pixels). A intensidade do sinal de “background” foi subtraída dos valores medidos das imagens (Figura 1).

Deteção de fragmentação nuclear (coloração “terminal transferase assay” - TUNEL)

A fragmentação do DNA em blastocistos iniciais e blastocistos foi observada após a marcação das células em apoptose pela coloração “*In situ* terminal deoxinucleotidyl transferase mediated dUTP Nick end labeling assay” (TUNEL; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), conforme recomendação do fabricante. Os embriões foram lavados por quatro vezes em PBS 1% PVP (PBS-PVP) e posteriormente fixados, com zona pelúcida intacta, em solução de paraformaldeído (4%), a temperatura ambiente por 1 hora. Os embriões foram permeabilizados em solução de Triton X-100 (0,5%, v/v) em citrato de sódio (0,1%), a temperatura ambiente por 30 minutos.

Os embriões reservados para o controle positivo foram incubados com DNase I (50 UI/mL de água Milli-Q) (RNAse free) a 37°C por 1 hora, enquanto que aqueles dos tratamentos permaneceram, pelo mesmo período, em gotas de 100 µL de PBS-PVP. Posteriormente, todos os embriões foram lavados em PBS-PVP e incubados, em câmara úmida, com 15 µL da mistura (1:9, da enzima – tubo 1 e do tampão da enzima – tubo 2, respectivamente) para a coloração de TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche Applied Science, IN, USA), por 1 hora a 37°C no escuro. Os oócitos/embriões reservados para o controle negativo foram incubados na ausência da enzima “terminal deoxynucleotidyl transferase” (TdT) (tubo 1, contida no kit). Posteriormente, foram incubados em solução Hoechst 33342 (1 µg/mL de PBS-PVP) por 30 minutos, em temperatura ambiente. Por fim, foram lavados em PBS-PVP e colocados entre lâmina e lamínula com glicerina tamponada (9:1). Posteriormente, foram avaliados em microscópio equipado com epifluorescência (Olympus, IX51), excitação de 510-550 nm e emissão de 590 nm, quanto à fragmentação de DNA (TUNEL positivas = fluorescência verde ou amarelada pontual dentro no núcleo) e excitação 404 nm e emissão 526 nm, quanto ao número total de células (determinado pelos núcleos corados em azul pelo corante Hoechst). Imagens representativas desta coloração podem ser observadas na Figura 1.

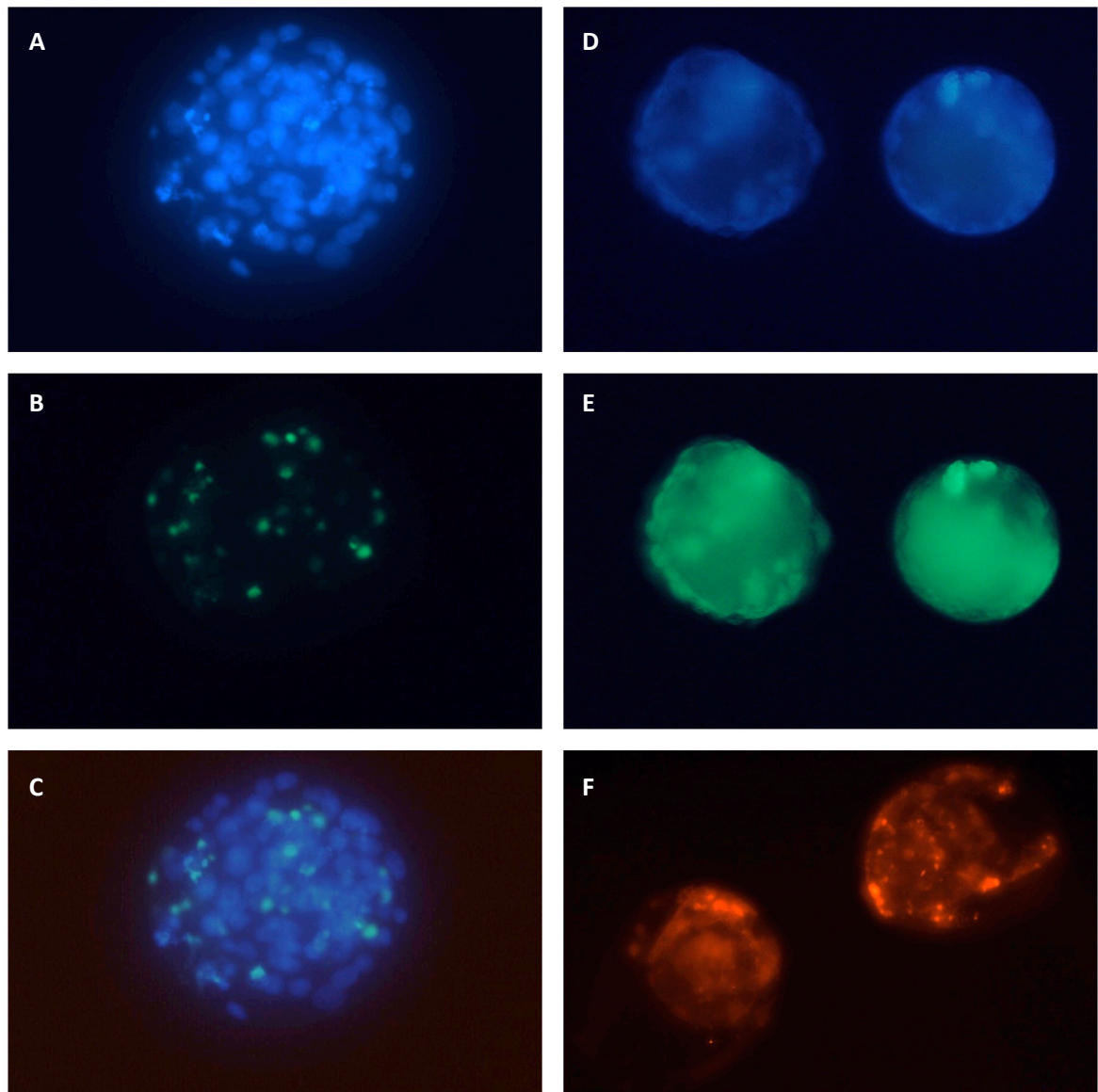


Figura 1. Imagem ilustrativa de embriões bovinos corados com a sonda fluorescente Hoechst 33342 para a identificação dos núcleos e contagem do número total de células (em azul, A); ensaio TUNEL para detecção das células em apoptose (em verde, B); sobreposição das imagens (C); embriões corados com a sonda fluorescente ThiolTracker Violet para detecção da glutathiona (GSH) intracelular (D); embriões corados com a sonda fluorescente H₂DCFDA para detecção das espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelulares (E); e embriões corados com a sonda fluorescente FLICA para mensuração da atividade de caspases 3 e 7 (F). Os embriões foram avaliados em microscopia de epifluorescência (ver no texto o detalhamento dos filtros utilizados para cada sonda). Aumento 20 X.

Delineamento experimental

COCs (n= 1678) foram MIV em meio sem a suplementação com antioxidantes (Controle) ou suplementados com 0,6 mM de cisteína associado à 100 µM de cisteamina e 100 UI de catalase (antioxidante; ATX). Após a MIV, os oócitos foram fertilizados *in vitro* e os prováveis zigotos foram cultivados em meio SOF. Do Dia 6 até o final do CIV os embriões foram cultivados na presença ou ausência de 5 µM de menadiona (MD), como se segue: 1) MIV + CIV na ausência de MD (Controle); 2) MIV ATX + CIV na ausência de menadiona (Controle ATX); 3) MIV + CIV na presença de menadiona (MD); ou 4) MIV ATX + CIV na presença de menadiona (ATX MD).

No Dia 7 foi avaliado o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos e os mesmos foram destinados às avaliações quanto aos níveis intracelulares de ROS e GSH, atividade de caspases, número total de blastômeros e ocorrência de apoptose.

Análise estatística

Dentro de cada replicata, um poço da placa de cultivo contendo 50 oócitos foi considerada a unidade experimental para cada grupo. O experimento foi repetido no mínimo 5 vezes, em dias diferentes. A taxa de blastocistos foi calculada considerando-se o número total de oócitos maturados.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando um efeito estatisticamente significativo foi encontrado, comparações múltiplas das médias foram determinadas pelo teste de Tukey (JMP versão 5.0.1, SAS Institute). As porcentagens foram transformadas em arco-seno raiz quadrada. As variáveis binomiais foram analisadas pelo teste de Qui-Quadrado. Diferenças com probabilidades (P) menores que 0,05 foram consideradas significativas.

3. RESULTADOS

O conteúdo intracelular de GSH em embriões bovinos (Figura 2), expressos em unidades arbitrárias de fluorescência, foram similares ($P>0,05$) em todos os grupos experimentais ($18,0\pm2,78$ a $21,1\pm2,40$).

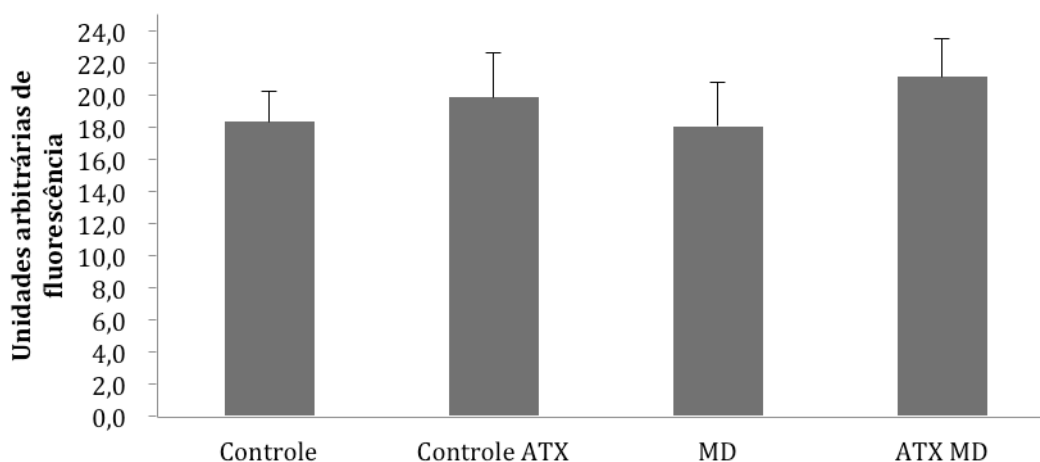


Figura 2. Concentrações intracelulares de GSH (determinados em unidades arbitrárias de fluorescência) em embriões produzidos *in vitro* submetidos ao estresse oxidativo e oriundos de oócitos maturados *in vitro* na presença de antioxidantes. Controle = embriões produzidos em meio SOFaa. Controle ATX = embriões produzidos a partir de oócitos maturados *in vitro* em meio contendo antioxidantes. MD = embriões produzidos em meio SOFaa na presença de 5,0 μ M de MD. ATX MD = embriões produzidos a partir de oócitos maturados *in vitro* em meio contendo antioxidantes e cultivados em SOFaa suplementado na presença de 5,0 μ M de MD. Não houve diferença entre os grupos pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

As menores concentrações intracelulares de ROS (Figura 3) em embriões bovinos, expressos em unidades arbitrárias de fluorescência, foram observados nos grupos Controle ($17,0\pm0,83$) e Controle ATX ($17,6\pm0,66$), os quais não diferiram ($P>0,05$) entre si e do grupo ATX MD ($19,0\pm0,91$). O maior acúmulo de ROS foi encontrado no grupo MD ($21,7\pm1,66$) que diferiu ($P<0,05$) dos grupos Controle e Controle ATX, porém não diferiu ($P>0,05$) do grupo ATX MD.

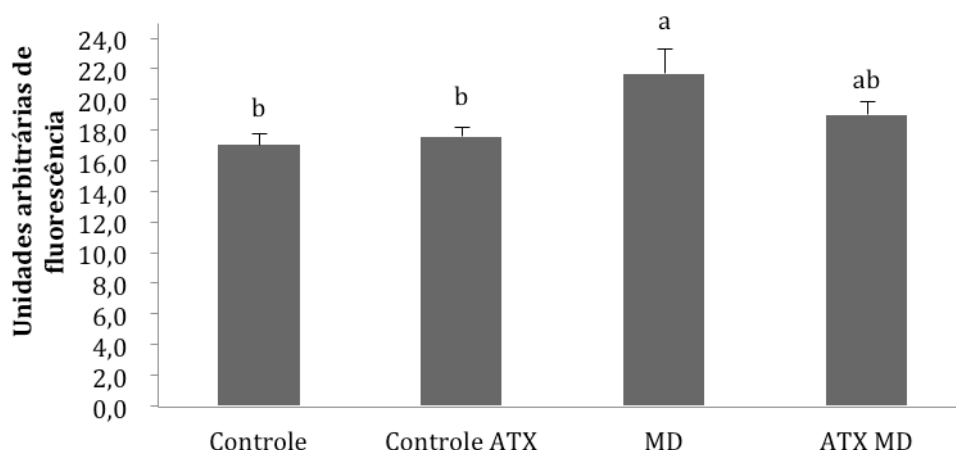


Figura 3. Concentrações intracelulares de ROS (determinados em unidades arbitrárias de fluorescência) em embriões produzidos *in vitro* submetidos ao estresse oxidativo e oriundos de oócitos maturados *in vitro* na presença de antioxidantes. Controle = embriões produzidos em meio SOFaa. Controle ATX = embriões produzidos a partir de oócitos maturados *in vitro* em meio contendo antioxidantes. MD = embriões produzidos em meio SOFaa na presença de 5,0 μ M de MD. ATX MD = embriões produzidos a partir de oócitos maturados *in vitro* em meio contendo antioxidantes e cultivados em SOFaa suplementado na presença de 5,0 μ M de MD. Barras com letras distintas diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os resultados de atividade de caspases para os diferentes grupos experimentais estão representados na Figura 4, expressos em unidades arbitrárias de fluorescência, e foram similares ($P > 0,05$) para todos os grupos experimentais ($33,3 \pm 3,90$ a $40,8 \pm 4,40$).

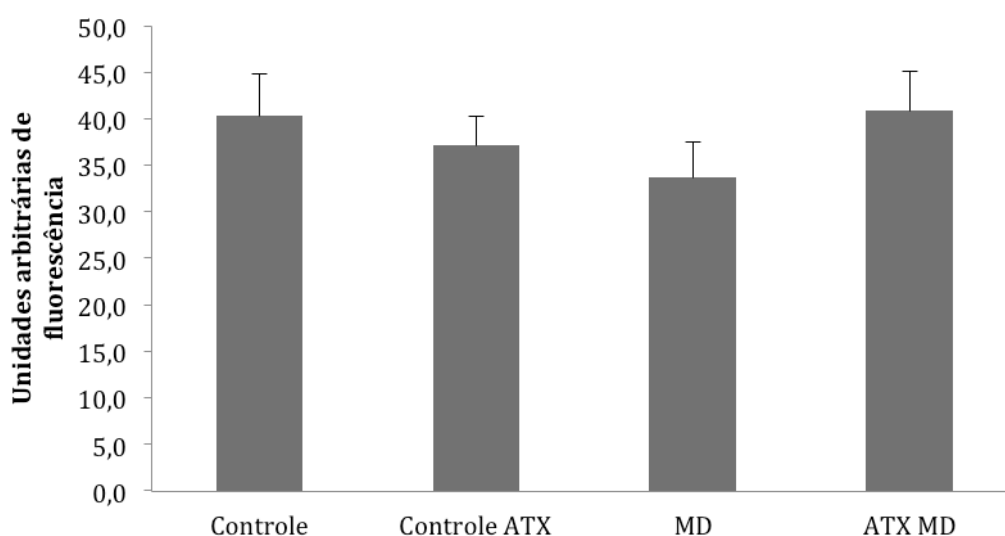


Figura 4. Atividade de caspases 3 e 7 (determinados em unidades arbitrárias de fluorescência) em embriões produzidos *in vitro* submetidos ao estresse oxidativo e oriundos de oócitos maturados *in vitro* na presença de antioxidantes. Controle = embriões produzidos em meio SOFaa. Controle ATX = embriões produzidos a partir de oócitos maturados *in vitro* em meio contendo antioxidantes. MD = embriões produzidos em meio SOFaa na presença de 5,0 μ M de MD. ATX MD = embriões produzidos a partir de oócitos maturados *in vitro* em meio contendo antioxidantes e cultivados em SOFaa suplementado na presença de 5,0 μ M de MD. Não houve diferença entre os grupos pelo Teste de Tukey ($P>0,05$).

O número total de células e a porcentagem de células em apoptose estão representados na Tabela 2. Não houve diferença ($P>0,05$) no número total de células entre os grupos experimentais ($68,6\pm2,07$ a $74,8\pm2,00$). As maiores porcentagens de apoptose foram encontradas nos grupos MD ($22,4\%\pm2,33$) e ATX MD ($22,3\%\pm1,38$) que não diferiram entre si ($P>0,05$), porém foram superiores ($P<0,05$) aos grupos Controle ($12,8\%\pm0,99$) e Controle ATX ($9,4\%\pm0,75$).

Tabela 1. Número total de células e porcentagem de apoptose em embriões produzidos *in vitro* submetidos ao estresse oxidativo e oriundos de oócitos maturados *in vitro* na presença de antioxidantes.

Grupos	Nº embriões	Número de células (média $\pm$ EPM)	% TUNEL (%média $\pm$ EPM)
Controle	57	70,6 $\pm$ 1,98	12,8 $\pm$ 0,99 ^b
Controle ATX	78	68,6 $\pm$ 2,07	9,4 $\pm$ 0,75 ^b
MD	22	70,4 $\pm$ 3,26	22,4 $\pm$ 2,33 ^a
ATX MD	37	74,8 $\pm$ 2,00	22,3 $\pm$ 1,38 ^a

Número total de células e porcentagem de apoptose em blastocistos produzidos *in vitro* na presença ou ausência de menadiona (MD). Controle = embriões produzidos em meio SOFaa. Controle = embriões produzidos em meio SOFaa. Controle ATX = embriões produzidos a partir de oócitos maturados *in vitro* em meio contendo antioxidantes. MD = embriões produzidos em meio SOFaa na presença de 5,0 μ M de MD. ATX MD = embriões produzidos a partir de oócitos maturados *in vitro* em meio contendo antioxidantes e cultivados em SOFaa suplementado na presença de 5,0 μ M de MD. Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P<0,05$).

A taxa de clivagem e blastocistos estão representadas na Figura 5. Não houve diferença ($P>0,05$) na taxa de clivagem entre os grupos experimentais ($79,7\%\pm1,66$ a $83,9\%\pm3,72$). Já a taxa de blastocistos foi menor ($P<0,05$) no grupo MD ($21,3\%\pm2,93$) em relação aos grupos Controle ($35,3\%\pm3,41$) e Controle ATX ($34,5\%\pm3,09$), porém o grupo ATX MD ($28,3\%\pm3,49$) não diferiu dos demais grupos experimentais ($P>0,05$).

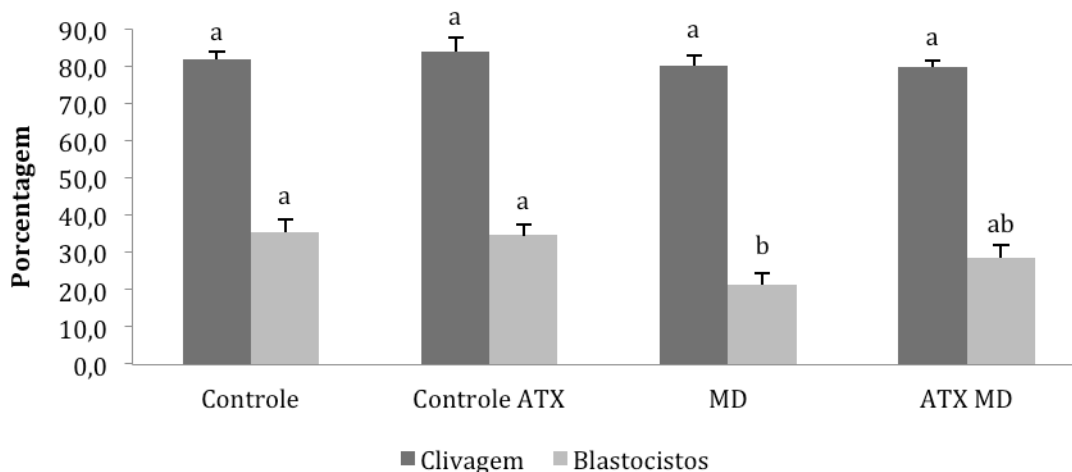


Figura 5. Taxa de clivagem e blastocistos obtidas à partir de oócitos maturados *in vitro* na presença ou não de antioxidante e dos embriões cultivados *in vitro* na presença ou ausência de menadiona (MD). Controle = embriões produzidos em meio SOFaa. Controle ATX = embriões produzidos a partir de oócitos maturados *in vitro* em meio contendo antioxidantes. MD = embriões produzidos em meio SOFaa na presença de 5,0 μM de MD. ATX MD = embriões produzidos a partir de oócitos maturados *in vitro* em meio contendo antioxidantes e cultivados em SOFaa suplementado na presença de 5,0 μM de MD. Barras com letras distintas diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P<0,05$).

4. DISCUSSÃO

Este estudo avaliou os efeitos da suplementação com a associação de antioxidantes intracelulares e extracelulares durante a MIV de oócitos bovinos sobre a aquisição de resistência aos danos decorrentes do estresse oxidativo induzido pela menadiona durante o CIV. Os principais resultados aqui relatados sugerem que: 1) o aumento dos níveis intracelulares de ROS e da apoptose associados à redução do desenvolvimento embrionário *in vitro* indicam que a adição de 5 μM de MD durante o CIV gerou uma condição de estresse oxidativo e (2) a suplementação do

meio de MIV foi associada a uma maior aquisição de resistência ao estresse oxidativo induzido pela MD sobre a competência para o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocistos, ao reduzir parcialmente os níveis intracelulares de ROS, no entanto não reduziu a ocorrência de apoptose.

Diversos compostos podem ser utilizados para modular a defesa contra o estresse oxidativo (GUÉRIN *et al.*, 2001). Dentre eles, antioxidantes não enzimáticos (GSH, ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno) e enzimáticos (glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase) demonstraram proteger embriões contra os danos decorrentes da ação das ROS (MORADO *et al.*, 2009). Neste estudo, os níveis intracelulares de GSH em blastocistos bovinos não foram afetados pela suplementação com antioxidantes durante a etapa de MIV e pela presença de menadiona durante o CIV. Sabe-se que a proteção contra o estresse oxidativo em embriões bovinos até a transição materno zigótica é determinada primeiramente pelos estoques maternos de antioxidantes nos oócitos (HARVEY *et al.*, 1995). No entanto, embriões pré-implantacionais apresentam reduzidos níveis de GSH, principalmente em decorrência de deficiências na biossíntese da glutathione durante o desenvolvimento embrionário (LIM *et al.*, 1996), o que sugere que existam outros mecanismos de defesa antioxidante. Mais recentemente, foi demonstrado que em embriões, a partir do estágio de 8 células, a principal via de resposta ao estresse oxidativo é mediada pelo fator NRF2 (nuclear factor like 2; GAD *et al.*, 2012). O NRF2 é um fator de transcrição que atua na regulação da expressão de genes antioxidantes de ação enzimática, como a SOD-1 e CAT. Logo, embriões que forem capazes de ativar a via de resposta mediada pelo NRF2 tem maior probabilidade de atingir o estágio de blastocisto (AMIN *et al.*, 2014), o que indica que o papel dos antioxidantes enzimáticos é fundamental na aquisição de competência para o desenvolvimento embrionário *in vitro*.

A adição da menadiona resultou em aumento nos níveis intracelulares de ROS, o que era esperado devido à sua ação de promover a redução enzimática de um e dois elétrons, convertendo o O_2 em O_2^- e H_2O_2 , respectivamente (MOSS *et al.*, 2009). Neste contexto, a menadiona têm sido amplamente utilizada como indutor de estresse oxidativo, utilizando-se como modelo de estudos o embrião bovino (ASSIS *et al.*, 2015). A suplementação com a associação de antioxidantes intra- e

extracelulares durante a MIV reduziu parcialmente os níveis intracelulares de ROS em embriões bovinos sob condição de estresse oxidativo induzido, no entanto, esse efeito não foi decorrente de um aumento nos estoques intracelulares de GSH nos blastocistos. É sabido que a proteção contra as ROS depende também de uma reserva endógena de enzimas antioxidantes, na forma de estoques de RNAm, armazenadas durante a oogênese e maturação oocitária na forma de RNAm (HARVEY *et al.*, 1995). Desta forma, os resultados indicam que os sistemas antioxidantes enzimáticos tenham também um papel fundamental sobre a aquisição de resistência à ação das ROS durante o desenvolvimento do embrião pré-implantacional (GAD *et al.*, 2012).

Elevados níveis de ROS, decorrentes da adição de menadiona, levaram ao aumento expressivo da porcentagem de células TUNEL-positivas (MOSS *et al.*, 2009), sem no entanto afetar o número total de blastômeros, da mesma forma como anteriormente reportado por Simões *et al.* (2013) e Moss *et al.* (2009). Sabe-se que o acúmulo de superóxido e H_2O_2 em blastocistos parece estar relacionado com maiores taxas de apoptose (MATWEE *et al.*, 2000), demonstrando que quanto maior a susceptibilidade ao estresse oxidativo, maior é o número de células em apoptose e tal correlação positiva já foi demonstrada em embriões (MOSS *et al.*, 2009) e espermatozoides bovinos (SIMÕES *et al.*, 2013). Elevados níveis de ROS causam danos no DNA em decorrência da ruptura das membranas mitocondriais com consequente liberação do citocromo C e ativação da cascata de caspases culminando com apoptose (TVRDÁ *et al.*, 2011). No entanto, a suplementação com antioxidantes intra- e extracelulares associados durante a MIV não minimizou a ocorrência de apoptose em blastocistos bovinos submetidos ao estresse oxidativo induzido durante o CIV. Já foi anteriormente demonstrado que a qualidade oocitária determina a proporção de oócitos que alcançam o estágio de blastocistos, no entanto as condições de incubação estabelecidas durante o cultivo têm maior impacto sobre a qualidade embrionária *in vitro* e, consequentemente, sobre a ocorrência de apoptose (RATY *et al.*, 2011). De acordo com Vandaele *et al.* (2007), a apoptose é predominantemente influenciada pela qualidade oocitária apenas até o estágio de mórula, já que durante as primeiras clivagens, o desenvolvimento embrionário é mantido pelo RNAm materno, proteínas e mitocôndrias sintetizadas e

estocadas durante a maturação oocitária. Após as primeiras clivagens, as condições de cultivo tem maior impacto sobre a qualidade do embrião e o aumento das ROS é o primeiro processo requerido para a indução da apoptose durante o desenvolvimento embrionário, seguido, posteriormente, pelo bloqueio da atividade das peroxidases (UFER *et al.*, 2010). A maioria dos genes implicados na resposta ao estresse são regulados por alterações no estado redox ou pelos níveis de ROS intracelulares. No entanto, os mecanismos pelos quais as ROS atuam sobre essas vias não estão completamente elucidados (ADLER *et al.*, 1999).

O aumento dos níveis de ROS induzido pela menadiona não resultou em aumento da atividade de caspases em blastocistos bovinos que sobreviveram aos estresse oxidativo induzido, apesar destes apresentarem maior porcentagem de apoptose. De maneira geral, as ROS promovem ativação da via mitocondrial da apoptose mediante liberação do citocromo C e fator promotor de apoptose (APAF-1), que ativam a caspase 9 e posteriormente a ativação da caspase executora 3 (SHCHEPINA, 2002). No entanto, a atividade de caspases e a fragmentação nuclear (TUNEL) podem não apresentar correlação positiva, pois são eventos cronologicamente distintos da via da apoptose, onde o aumento da atividade das caspases ocorre anteriormente à formação dos corpos apoptóticos (VANDAELE *et al.*, 2007). Para que esta correlação pudesse ter sido observada no presente estudo, talvez a abordagem deveria ter sido diferente, podendo ser interessante focar na detecção da atividade de caspases em embriões sobreviventes e não-sobreviventes, ou ainda nas primeiras horas de incubação com a menadiona.

De maneira semelhante, a suplementação com antioxidantes durante a MIV também não alterou a atividade de caspases em blastocistos bovinos submetidos ao estresse oxidativo induzido. Recentemente foi demonstrado que transcritos maternos da caspase 3 foram expressos em apenas 40% dos oócitos bovinos maturados, mas não foram detectados em oócitos imaturos (YUAN *et al.*, 2005). Ainda a influência da qualidade oocitária se torna evidente após a fertilização e até a transição materno-zigótica no estágio de 8-16 células, onde o genoma embrionário é ativado. Portanto, a viabilidade embrionária depende apenas parcialmente da qualidade oocitária (VANDAELE *et al.*, 2007), sendo que as condições de cultivo exercem maior impacto sobre a ativação das vias da apoptose mediada pelas

caspsases durante o desenvolvimento pré-implantacional de embriões bovinos (RATY *et al.*, 2011).

A indução do estresse oxidativo exerceu efeito negativo sobre a taxa de blastocistos (ASSIS *et al.*, 2015; MOSS *et al.*, 2009) e a suplementação com antioxidantes durante a MIV reduziu parcialmente o impacto sobre o desenvolvimento embrionário. De maneira semelhante a outros relatos, o estresse oxidativo induzido resultou em redução da qualidade, evidenciado pelo aumento da fragmentação nuclear, aumento nos níveis intracelulares de ROS (MOSS *et al.*, 2009) e bloqueio ou atraso do desenvolvimento até o estágio de blastocistos (ASSIS *et al.*, 2015), possivelmente por afetar de maneira drástica o metabolismo embrionário (TAKAHASHI *et al.*, 2012), bem como pelo estabelecimento do desequilíbrio redox (GUÉRIN *et al.*, 2001). Em outros estudos a concentração de 5 μ M de MD levou à parada do desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocistos (MOSS *et al.*, 2009), o que sugere que essa concentração possa exercer um efeito embriotóxico, visto que embriões pré-implantacionais são muito susceptíveis aos danos decorrentes das ROS. Possivelmente, isso seja decorrente da diferença entre as condições de incubação e meios de cultivo utilizados nos diferentes estudos, o que sabidamente exerce forte impacto sobre a qualidade e competência embrionário *in vitro* (GUÉRIN *et al.*, 2001).

Ainda, blastocistos bovinos que sobrevivem ao estresse oxidativo apresentam modificações no transcriptoma, com intuito de se adaptarem às perturbações no estado redox, porém tais alterações podem comprometer a sinalização celular e culminar em degeneração embrionária ou falha no reconhecimento materno (CAGNONE *et al.*, 2013). No entanto, mais estudos devem ser conduzidos para verificar se as respostas adaptativas ao estresse oxidativo não comprometem a viabilidade embrionária. Em suma, o estudo dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e diferenciação em embriões pré-implantacionais associado ao aprimoramento das condições de incubação estabelecidas durante o cultivo *in vitro* é fundamental para que se possa aprimorar o sucesso da PIV (TAKAHASHI *et al.*, 2012).

5. CONCLUSÃO

A suplementação com a associação de antioxidantes intra- (cisteína e cisteamina) e extracelulares (catalase) durante a maturação *in vitro* minimizou os efeitos decorrentes do estresse oxidativo induzido pela menadiona em embriões bovinos, visto que a concentração intracelular de ROS e taxa de blastocistos foram semelhantes ao controle.

REFERÊNCIAS

- ADLER, V.; Y, Z.; TEW, K.D.; RONAI, Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. **Oncogene**, v. 18, p. 6104-6111, 1999.
- AMIN, A.; GAD, A.; SALILEW-WONDIM, D.; PRASTOWO, S.; HELD, E.; HOELKER, M.; RINGS, F.; THOLEN, E.; NEUHOFF, C.; LOOFT, C.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Bovine embryo survival under oxidative-stress conditions is associated with activity of the NRF2-mediates oxidative-stress-response pathway. **Mol. Reprod. Dev.**, v.81, p.497-513, 2014.
- ASSIS, P.M.; CASTRO, L.S.; SIQUEIRA, A.F.P.; DELGADO, J.C.; HAMILTON, T.R.S.; GOISSIS, M.D.; MENDES, C.M.; NICHI, M.; VISINTIN, J.A.; ASSUMPÇÃO, M.E.O. System for evaluation of oxidative stress on in-vitro-produced bovine embryos. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 31, p. 577-580, 2015.
- BAIN, N.T.; MADAN, P.; BETTS, D.H. The early embryo to intracellular reactive oxygen species is developmentally regulated. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.23, p.561-575, 2011.
- CAGNONE, G.L.M.; SIRARD, M. Transcriptomic signature to oxidative stress exposure at the time of embryonic genome activation in bovine blastocysts. **Mol. Reprod. Dev.**, v.80, p.297-314, 2013.
- CORRÊA, G. A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T. C. D.; FRANCO, M. M.; DODE, M. ^a N. Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: Effect in production and expression of genes related with oxidative stress. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 132-142, 2008.
- DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C. The importance of having high glutathione (GSH) levels after bovine in vitro maturation on embryo development: effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology**, v.53, p. 761-842, 2000.
- DELEUZE, S.; GOUDET, G. Cysteamine supplementation of in vitro maturation media: a review. **Reprod. Domest. Anim.**, v.45, p.476-482, 2010.
- FEUGANG, J.M.; VAN LANGENDONCKT, A.; SAYOUD, H.; REES, J.F.; PAMPFER, S.; MOENS, A.; et al. Effect of prooxidant agents added at the morula/blastocyst stage on bovine embryo development, cell death and glutathione content. **Zygote**, v.11, p.107-125, 2003.

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 prooxidants agents. **Theriogenology**, v.63, p.71-90, 2004.

FUKUI, Y.; OYAMADA, T. Oxygen tension and medium supplements for in vitro maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined médium. **J. Reprod.**, v.50, n.1, p.107-117, 2004.

GAD, A.; HOELKER, M.; BESENFELDER, U.; HAVLICEK, V.; CINAR, U.; RINGS, F.; HELD, E.; DUFORT, I.; SIRARD, M.A.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Molecular mechanisms ant pathways involved in bovine embryonic genome activation and their regulation by alternative in vivo and in vitro culture conditions. **Biol. Reprod.**, v. 87, p. 100, 2012.

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

HARVEY, M.B.; ARCELLANA-PANLILIO, M.Y.; ZHANG, X.; SCHULTZ, G.A.; WATSON, A.J.. Expression of genes encoding antioxidants enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures employed for embryo co-cultured. **Biol. Reprod.**, v.53, p.532-572, 1995.

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

LIM, J.M.; LIOU, S.S.; HANSEL, W. Intracytoplasmatic glutathione concentration and the role of beta-mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. **Theriogenology**, v.20, p.407-423, 1996.

MARTÍN-ROMERO, F.J.; MIGUEL-LASOBRAS, E.M.; DOMÍNGUEZ-ARROYO, J.A.; GONZÁLEZ-CARRERA, E.; ÁLVAREZ, I.S. Contribution of culture media to oxidative stress and its effects on human oocytes. **Reprod. Biomed. Online**, v.17, p.652-661, 2008.

MATWEE, C.; BETTS, D.; KING, W.A. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote**, v. 8, p. 57-68, 2000.

MINGOTI G.Z.; CAIADO CASTRO V.S.; MÉO S.C.; BARRETTO L.S.; GARCIA J.M. The effect of interaction between macromolecule supplement and oxygen tension on bovine oocytes and embryos cultured in vitro. **Zygote**, v.17, n. 4, p.321-328, 2009.

MONKS, T.J.; HANZLIK, R.P.; COHEN, G.M.; ROSS, D.; GRAHAM, D.G. Quinone chemistry and toxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 112, p.2-16, 1992.

MOSS, J.I.; PONTES, E.; HANSEN, P.J. Insulin-like growth factor-1 protects preimplantation embryos from anti-developmental actions of menadione. **Arch. Toxicol.**, v.83, p.1001-1007, 2009.

NABENISHI, H.; OHTA, H.; NISHIMOTO, T.; MORITA, T.; ASHIZAWA, K.; TSUZUKI, Y. The effects of cysteine addition during *in vitro* maturation on the development competence, ROS, GSH and apoptosis level of bovine oocyte exposed to heat-stress. **Zygote**, doi:10.1017/S0967199411000220, p.1-11, 2011.

MORADO, S.A.; CETICA, P.D.; BECONI, M.T.; DALVIT, G.C. Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.21, p.608-614, 2009.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M.A.; FIRST, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biol. Reprod.**, v.38, p.1171-1188, 1988.

RATY, M.; KETOJA, E.; PITKANEN, V.; AHOLA, V.; KANANEN, K.; PEIPPO, J. In vitro maturation supplements affect developmental competence of bovine cumulus-oocyte complexes and embryo quality after vitrification. **Cryobiology**, v. 53, p. 245-255, 2011.

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

SHCHEPINA, L.A.; et al. Respiration and mitochondrial membrane potential are not required for apoptosis and anti-apoptotic action of BCL-2 in hela cells. **Biochemistry (Moscow)**, v.67, p.222-226, 2002.

SIMÕES, R.; FEITOSA, W.B.; SIQUEIRA, A.F.P.; NICHI, M.; PAULA-LOPES, F.F.; MARQUES, M.G.; PERES, M.A.; BARNABE, V.H.; VISINTIN, J.A.; ASSUMPÇÃO, M.E.O. Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo in vitro development outcome. **Reproduction**, v. 146, p.433-441, 2013.

TAKAHASHI, M. Oxidative stress and redox regulation on *in vitro* development of mammalian embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v.58, p.1-9, 2012.

TAMURA, H.; TAKASAKI, T.; TAKETANI, T.; TANABE, M.; KIZUKA, F.; LEE, L.; TAMURA, I.; MAEKAWA, R.; AASADA, H.; YAMAGATA, Y.; SUGINO, N. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. **Journal of Ovarian Research**, v. 5, p.1-9, 2012.

TVRDÁ, E.; KNAZICKÁ, Z.; BÁRDOS, L.; MASSÁNYI, P.; LUKÁČ, N. Impact of oxidative stress on male fertility – a review. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.59, p.465-484, 2011.

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

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

VANDAELE, L.; MATEUSEN, B.; MAES, D.G.D.; DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Temporal detection of caspase-3 and -7 in bovine in vitro produced embryos of diferente developmental capacity. **Reproduction**, v.133, p. 709-718, 2007.

YUAN, Y.Q.; VAN SOOM, A.; LEROY, J.L.M.R.; DEWULF, J.; VAN ZEREVEN, A.; DE KRUIF, A.; PEELMAN, L.J. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. **Theriogenology**, v.63, p.2147-2163, 2005.

CAPÍTULO 4 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM IGF-1 DURANTE O CULTIVO *IN VITRO* SOBRE A QUALIDADE E DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS EM CONDIÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO

RESUMO – O objetivo deste estudo foi avaliar se a suplementação do meio de cultivo *in vitro* com IGF-1 (IGF) é capaz de minimizar os efeitos deletérios do estresse oxidativo induzido pela menadiona (MD) durante o CIV, através da avaliação da concentração intracelular de ROS e glutatona (GSH), atividade de caspases, ocorrência de apoptose, desenvolvimento embrionário, criotolerância e padrão de expressão gênica, como se segue: 1) MIV + CIV na ausência de menadiona (Controle); 2) MIV + CIV IGF (IGF); 3) MIV + CIV na presença de menadiona (MD); 4) MIV + CIV IGF na presença de menadiona (IGF MD). A concentração intracelular de GSH foi similar ($P>0,05$) entre os grupos (18,0 a 20,0). O acúmulo intracelular de ROS encontrado no grupo MD (21,7) foi superior ($P<0,05$) ao observado no grupo Controle (17,0), já os grupos IGF (19,2) e IGF MD (18,0) não diferiram ($P>0,05$) dos grupos mencionados. Com relação à atividade de caspases, não houve diferença ($P>0,05$) entre os grupos (33,7 a 40,3). O número total de células não diferiu ($P>0,05$) entre os grupos (66,7 a 72,7). As maiores porcentagens de apoptose foram encontradas no grupo MD (22,3%) e foram superiores ($P<0,05$) aos grupos Controle (12,8%), IGF (9,0%) e IGF MD (15,6%). Níveis intermediários de porcentagem de apoptose foram encontrados nos grupos Controle e IGF MD, que não diferiram entre si ($P>0,05$), porém tais grupos foram superiores ($P<0,05$) comparado ao grupo IGF, que apresentou as menores porcentagens ($P<0,05$). A taxa de blastocistos ($P<0,05$) foi menor no grupo MD (21,30%) comparados aos grupos Controle (35,4%) e IGF (34,5%), porém o grupo IGF MD (28,3%) não diferiu ($P>0,05$) dos demais grupos. A taxa de re-expansão foi menor ($P<0,05$) no grupo MD (49,1%) em relação aos grupos Controle (77,4%) e IGF (69,2%), porém tais grupos não diferiram entre si ($P>0,05$). O grupo IGF MD (57,6%) não diferiu ($P>0,05$) dos grupos IGF e MD, porém foi inferior ($P<0,05$) comparado ao grupo Controle. Não houve diferença ($P>0,05$) na expressão relativa do gene CASP3 (0,95 a 1,42) e

GPX-1 (0,52 a 1,04) entre os grupos. No entanto, a expressão do gene SOD-1 foi maior ($P < 0,05$) no grupo IGF MD (1,04) comparado ao grupo IGF (0,59), porém estes grupos não diferiram ($P > 0,05$) dos grupos Controle (0,78) e MD (0,74). Em conclusão, a adição de IGF-1 durante o CIV aumentou a resistência ao estresse oxidativo induzido pela MD, visto que aumentou a expressão do gene antioxidante SOD-1, o que resultou em redução da apoptose e melhorou o desenvolvimento e criotolerância de blastocistos bovinos.

Palavras-chave: produção *in vitro*, menadiona, apoptose

1. INTRODUÇÃO

O sistema de produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos é amplamente empregado com finalidades de pesquisa e comercial, porém tais embriões apresentam pior qualidade e competência de desenvolvimento em comparação com os obtidos *in vivo*. Ainda, embriões produzidos *in vitro* são mais sensíveis às baixas temperaturas e possuem criotolerância inferior quando comparados a embriões produzidos *in vivo* (IMAI *et al.*, 2002). Isso ocorre devido ao aumento na concentração lipídica de embriões durante o cultivo *in vitro* (CIV), em decorrência da inclusão de certos componentes no meio de cultivo como, por exemplo, o soro fetal. O cultivo *in vitro* afeta o equilíbrio das reações de redução e oxidação (redox) através do aumento da produção de ROS ou redução da capacidade antioxidante, resultando na produção de embriões de pior qualidade (CAGNONE *et al.*, 2013). Neste contexto, o acúmulo de lipídeos e consequente, o aumento da peroxidação lipídica decorrente da ação das espécies reativas de oxigênio (ROS) no embrião produzidos *in vitro* é prejudicial ao seu desenvolvimento e criotolerância (NEDAMBALE *et al.*, 2006).

O estresse oxidativo é o resultado do desequilíbrio entre a produção de ROS e os mecanismos celulares antioxidantes (FEUGANG *et al.*, 2003), e pode acarretar diferentes tipos de injúrias celulares, tais como peroxidação lipídica, oxidação de aminoácidos e ácidos nucleicos, bem como apoptose. Mais especificamente, elevados níveis de ROS causam danos no DNA em decorrência da ruptura das membranas mitocondriais com consequente liberação do citocromo C e ativação da cascata de caspases, culminando com apoptose (TVRDÁ *et al.*, 2011). Estes fatores em conjunto podem diminuir a viabilidade embrionária (KITAGAWA *et al.*, 2004), especialmente em embriões produzidos *in vitro* que são mais susceptíveis aos danos oxidativos, visto que seus mecanismos de defesa são insuficientes para proteger sua delicada estrutura celular (GOTO *et al.*, 1993) e consequentemente, os tornam mais sensíveis à criopreservação (SEIDEL *et al.*, 2006).

Considerando a importância do impacto do estresse oxidativo durante o cultivo *in vitro*, diversos estudos analisaram os efeitos da exposição de agentes pró-

oxidantes como a 2,2'-azobis (2-amidinopropano)di-hidrocloreto (AAPH) e menadiona (MOSS *et al.*, 2009), que aumentam a produção de ROS e do DL-butionina (S, R) sulfoximina (BSO), um inibidor específico da síntese de glutathione sobre a qualidade e desenvolvimento embrionário *in vitro* (FEUGANG *et al.*, 2003; GUÉRIN *et al.*, 2001). A menadiona, ou vitamina K₃, é uma naftoquinona utilizada como fonte de vitaminas na nutrição animal (MOSS *et al.*, 2009). Na presença de oxigênio, esta substância induz a geração de O₂⁻, H₂O₂ e outras ROS (MONKS *et al.*, 1992), resultando em apoptose (ASSIS *et al.*, 2015). Neste contexto, sabe-se que o acúmulo de ROS resulta em redução da qualidade embrionária, evidenciado pelo aumento da fragmentação nuclear (MOSS *et al.*, 2009) e bloqueio ou atraso do desenvolvimento até o estágio de blastocistos (ASSIS *et al.*, 2015), possivelmente por afetar de maneira drástica o metabolismo embrionário (TAKAHASHI *et al.*, 2012), bem como pelo desequilíbrio redox (GUÉRIN *et al.*, 2001). Desta forma, a utilização da menadiona como geradora de estresse oxidativo em sistemas de PIV pode ser um modelo interessante para a avaliação do efeito protetor ou promotor de sobrevivência de drogas específicas, tais como antioxidantes e fatores de crescimento.

Para evitar danos induzidos pelo estresse oxidativo ao embrião, vários antioxidantes podem ser adicionados aos meios de cultivo *in vitro* para melhorar o desenvolvimento com sucesso variável, como β-mercaptoetanol, cisteína, cistina e cisteamina (DE MATOS *et al.*, 1997; ALI *et al.*, 2003). Estes compostos servem como precursores da síntese de glutathione (GSH), a qual atua na manutenção do estado redox nas células, protegendo-as contra os danos oxidativos (DELEUZE & GOUDET, 2010) ao promover a detoxificação de peróxidos lipídicos e de proteínas tioladas, bem como a remoção de H₂O₂ em embriões (JOHNSON & NARSESFAHANI, 1994).

Além dos antioxidantes, outros fatores já demonstraram desempenhar importante papel no desenvolvimento embrionário em condições adversas, como por exemplo, fatores de crescimento. Diversos relatos indicam que o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I) atua como um fator de sobrevivência ao reduzir os efeitos deletérios sobre o desenvolvimento e viabilidade embrionária quando blastocistos são submetidos a condições adversas, como

estresse oxidativo (MOSS *et al.*, 2009; KURZAWA *et al.*, 2002). O IGF-I exerce efeito positivo sobre o desenvolvimento pré-implantacional por estimular o metabolismo e o crescimento embrionário, via redução da apoptose e aumento do número total de blastômeros (LOTT *et al.*, 2010).

Os efeitos da suplementação com IGF-1 durante a CIV já foram bem documentados, no entanto os efeitos dessa suplementação sobre a aquisição de resistência aos danos decorrentes do estresse oxidativo sobre a qualidade e criotolerância embrionárias nunca foram investigadas. Desta forma, no presente estudo, temos como hipótese que a suplementação com IGF-1 durante a etapa de cultivo *in vitro* seja capaz de minimizar os efeitos deletérios do estresse oxidativo induzido pela menadiona sobre o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos. Portanto, neste estudo foi avaliado se: (1) a adição de 5 μ M de MD durante o cultivo *in vitro* gera estresse oxidativo; (2) a suplementação do meio de CIV com IGF-1 é capaz de minimizar os efeitos deletérios do estresse oxidativo induzido durante o CIV, avaliando-se especificamente as concentrações intracelulares de ROS e de glutathiona (GSH), atividade de caspases e ocorrência de apoptose, desenvolvimento e criotolerância embrionários, bem como expressão de genes correlacionados com a apoptose e mecanismos antioxidantes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes químicos

Os reagentes utilizados foram da empresa Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), caso contrário estão especificados no texto. Todos os reagentes são testados pra cultivo celular. O meio de MIV utilizado foi o TCM-199 (Gibco, Invitrogen Co., Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Invitrogen Co.), 0,2 mM de piruvato, 25 mM de bicarbonato de sódio, 50 μ g/mL de amicacina, 0,5 μ g/mL de FSH (Folltropin-V, Bionique Animal Health, Ontario, Candá) e 100 UI/mL de hCG (Vetecor, Hertape Calier). O meio de fertilização utilizado foi o *Tyrode's albumin lactate pyruvate* (TALP), previamente

descrito (PARRISH *et al.*, 1988), contendo 0,2 mM de piruvato, 13 mM de lactato de sódio, 50 µg/mL de amicacina e 40 µL/mL de solução de PHE (20 µM de penicilamina, 10 µM hipotaurina, e 2 µM epinefrina), 10 µg/mL heparina e 6 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) livre de ácidos graxos. Materiais plásticos e tubos foram obtidos da empresa Corning Inc. (Acton, MA, USA). O meio de cultivo embrionário utilizado foi o *Synthetic Oviduct Fluid* (SOF) modificado, previamente descrito (VAJTA *et al.*, 1999) suplementado com 0,2 mM de L-glutamina, 0,34 mM de citrato de sódio, 2,8 mM de myo-inositol, 2% de BME aminoácidos essenciais, 1% MEM aminoácidos não essenciais, 50 µg/mL de amicacina, 5 mg/mL de BSA e 2,5% (v/v) de SFB.

Obtenção de oócitos e maturação *in vitro*

Ovários de vacas abatidas em frigoríficos foram transportados até o laboratório a uma temperatura entre 30-35°C. Complexos *cumulus*-oócitos (COCs) foram aspirados de folículos antrais (3-8 mm de diâmetro), com seringa acoplada a uma agulha 18-G. O material aspirado foi transferido para tubos de 50 mL e decantado por 15 minutos e somente oócitos circundados com pelo menos quatro camadas de células do *cumulus* compactas e com citoplasma contendo granulação homogênea foram selecionados para o cultivo de maturação. Foram transferidas 50 estruturas para cada poço da placa de cultivo de 4 poços (NUNC®, Nunclon Delta Treated 4-well IVF Dish, Denmark), contendo 500 µL de meio de maturação (as diferenças entre os grupos estão descritas no delineamento experimental). O cultivo de maturação foi realizado em atmosfera de 5% CO₂ em ar e com máxima umidade, durante 22 horas.

Separação espermática e fertilização *in vitro*

Ao término da MIV, os oócitos foram submetidos à fecundação utilizando sêmen de um único touro Nelore (*Bos indicus*) da mesma partida e com fertilidade comprovada para produção *in vitro*. As palhetas foram descongeladas à temperatura de 36°C por 40 segundos e os espermatozoides móveis foram selecionados e separados do diluidor por centrifugação em gradiente de densidade descontínua de Percoll (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) em duas fases (250 µL de Percoll 45%

sobre 250 µL de Percoll 90%, em microtubo de 1,5 mL) a 2500xg por 7 minutos. O sedimento recuperado foi avaliado quando ao volume, concentração e motilidade espermática. A concentração espermática utilizada foi 2×10^6 espermatozoides/mL de meio de fertilização. Foram adicionados 25 oócitos/gota, onde permanecerão em atmosfera de 5% de CO₂ em ar a 38,5°C durante 18-22 horas. O dia da fertilização foi considerado como Dia 0.

Cultivo embrionário *in vitro*

Após a fertilização os prováveis zigotos foram transferidos para o meio de CIV e cultivados em monocamada de células do cumulus. O cultivo foi realizado em poços de placas de cultivo de 4 poços (NUNC®, Nunclon Delta Treated 4-well IVF Dish, Denmark) contendo 500 µL de meio SOF suplementado com 100 ng/mL IGF-1 (IGF) ou sem a suplementação (Controle), em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ em ar e temperatura de 38,5°C por até sete dias.

Após 72 horas de cultivo, 50% do meio de cultivo foi renovado. A clivagem foi avaliada 72 horas pós-inseminação (hpi), e o desenvolvimento embrionário foi avaliado às 168 hpi (Dia 7). Do Dia 6 até o final do CIV os embriões foram cultivados em meio SOF na presença ou ausência de 5 µM menadiona (MOSS *et al.*, 2009).

Mensuração do conteúdo intracelular de GSH reduzida

O conteúdo intracelular de GSH reduzida foi quantificado através da utilização da sonda fluorescente ThiolTracker™ Violet (Glutathione Detection Reagent; Molecular probes, Invitrogen, Oregon, USA), de acordo com as informações do fabricante. Resumidamente, os embriões foram desnudados e lavados duas vezes em PBS e, posteriormente, incubados em 20 µM de ThiolTracker™ Violet durante 30 minutos no escuro, a 37,0°C em 5% de CO₂ em ar. Posteriormente, foram lavados duas vezes em PBS e foram avaliados imediatamente em microscópio invertido equipado com epifluorescência (Olympus, IX51), sob excitação de 404 nm e emissão de 526 nm. As imagens foram fotografadas e analisadas pelo programa Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc., Version 5.0.1.26) para quantificação da intensidade de fluorescência emitida.

Mensuração do conteúdo intracelular de ROS pelo ensaio com diclorofluoresceína

O conteúdo intracelular de ROS (H_2O_2 , $\text{HO}\cdot$, $\text{ROO}\cdot$) foi quantificado através da sonda fluorescente diacetato de 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA ; Molecular Probes), como descrito por Bain *et al.* (2011). O procedimento foi realizado nos embriões após a remoção das células do cumulus. Os embriões foram lavados duas vezes em PBS e incubados em 5 μM de H_2DCFDA durante 30 minutos, no escuro, a 38,5°C e 5% de CO_2 em ar. Posteriormente, foram lavados duas vezes em PBS e avaliados imediatamente em microscópio invertido equipado com epifluorescência (Olympus IX51; excitação de 495 nm e emissão de 520 nm). As imagens obtidas foram posteriormente analisadas pelo programa Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc. Version 5.0.1.26) para quantificação da intensidade de fluorescência emitida, mensurada em pixels. Quanto maior a intensidade de fluorescência, maior o conteúdo intracelular de ROS.

Mensuração da atividade das caspases 3 e 7

A mensuração da atividade das caspase 3 e 7 foi realizada nos blastocistos expandidos pela coloração com a sonda fluorescente "Image iT LIVE Red Caspase-3 and-7 Detection Kit" (FLICA, Molecular Probes, Invitrogen, OR, USA), de acordo com as informações do fabricante. Brevemente, os embriões foram incubadas em 10 μL da solução 30 X FLICA em câmara úmida a 37 C por 1 hora, no escuro. Em seguida, foram lavados na solução 1 X *buffer* e fixados em paraformaldeído 4% por 40 minutos. Foram montadas as lâminas com glicerol e os embriões corados foram avaliados imediatamente em microscópio invertido equipado com epifluorescência (Olympus, IX51), sob excitação de 550 nm e emissão de 595 nm. As imagens foram fotografadas e analisadas pelo programa Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc., Version 5.0.1.26) para quantificação da intensidade de fluorescência emitida.

Detecção de fragmentação nuclear (coloração “terminal transferase assay” - TUNEL)

A fragmentação do DNA em blastocistos iniciais e blastocistos foi observada após a marcação das células em apoptose pela coloração “*In situ* terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick end labeling assay” (TUNEL; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), conforme recomendação do fabricante. Os embriões foram lavados por quatro vezes em PBS 1% PVP (PBS-PVP) e posteriormente fixados, com zona pelúcida intacta, em solução de paraformaldeído (4%), a temperatura ambiente por 1 hora. Os embriões foram permeabilizados em solução de Triton X-100 (0,5%, v/v) em citrato de sódio (0,1%), a temperatura ambiente por 30 minutos.

Os embriões reservados para o controle positivo foram incubados com DNase I (50 UI/mL de água Milli-Q) (RNAse free) a 37°C por 1 hora, enquanto que aqueles dos tratamentos permanecerão, pelo mesmo período, em gotas de 100 µL de PBS-PVP. Posteriormente, todos os embriões foram lavados em PBS-PVP e incubados, em câmara úmida, com 15 µL da mistura (1:9, da enzima – tubo 1 e do tampão da enzima – tubo 2, respectivamente) para a coloração de TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche Applied Science, IN, USA), por 1 hora a 37°C no escuro. Os oócitos/embriões reservados para o controle negativo foram incubados na ausência da enzima “terminal deoxynucleotidyl transferase” (TdT) (tubo 1, contida no kit). Posteriormente, foram incubados em solução Hoechst 33342 (1 µg/mL de PBS-PVP) por 30 minutos, em temperatura ambiente.

Por fim, foram lavados em PBS-PVP e colocados entre lâmina e lamínula com glicerina tamponada (9:1). Posteriormente, foram avaliados em microscópio equipado com epifluorescência (Olympus, IX51), excitação de 510-550 nm e emissão de 590 nm, quanto à fragmentação de DNA (TUNEL positivas = fluorescência verde ou amarelada pontual dentro no núcleo) e excitação 404 nm e emissão 526 nm, quanto ao número total de blastômeros (determinado pelos núcleos corados em azul pelo corante Hoechst).

Vitrificação e aquecimento dos embriões

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

Apenas blastocistos expandidos, obtidos no dia 7 do CIV, de grau 1 e 2, classificados de acordo com o Manual da IETS (WRIGHT, 2009), foram selecionados para a vitrificação. Os embriões foram lavados duas vezes em solução de manutenção sem crioprotetores (“Holding”) antes de serem transferidos para a solução VI-I de vitrificação, durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente, foram transferidos para solução VI-II, durante 60 segundos em temperatura ambiente. Os embriões foram então depositados na porção final da haste de vitrificação com o mínimo volume de meio. Os protetores das hastes foram colocados horizontalmente no vapor de nitrogênio (N₂) líquido por alguns minutos antes de iniciar o procedimento, para então serem mergulhados verticalmente de modo a ficarem totalmente submersos. Finalmente, as hastes contendo os embriões foram introduzidas no protetor, sendo então armazenadas em botijões criogênicos até o momento do uso nas etapas posteriores.

Para o aquecimento dos embriões, as hastes foram retiradas do N₂ e a extremidade contendo os embriões foi imersa em solução DV-I de desvitrificação durante 1 minuto, a 37°C, até que a microgota fosse desfeita. Em seguida, os embriões foram transferidos para a solução DV-II por 3 minutos em temperatura ambiente e, finalmente, para a solução DV-III por 10 minutos em temperatura ambiente. Por fim, foram lavados duas vezes em solução de lavagem em temperatura ambiente e cultivados em meio SOFaa por 24 horas em atmosfera de 5% CO₂. Ao final do período, foram avaliadas as taxas de re-expansão embrionária (sobrevivência *in vitro*).

Extração de RNA total e reação de transcrição reversa

Com intuito de avaliar os efeitos do estresse oxidativo induzido e os possíveis efeitos protetores do IGF-1 sobre o desenvolvimento e criotolerância embrionários foi avaliada a expressão de genes relacionados com apoptose (CASP3) e mecanismos antioxidantes (GPX1 e SOD-1). Para tanto, *pools* de 5 blastocistos

expandidos grau I, obtidos no dia 7 do cultivo, foram coletados. Brevemente, foram lavados duas vezes em PBS suplementado com 0,1% de PVP (PBS-PVP em água ultra pura; Sigma) e incubados em solução 0,1% (p/v) de pronase (*Streptomyces griseus*; Roche, Nutley, NJ, USA) em PBS-PVP para a remoção da zona pelúcida. Posteriormente, foram lavados duas vezes em PBS-PVP e transferidos para microtubos em 2 µL de PBS-PVP, congelados rapidamente em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80° C até a extração do RNA.

A extração do RNA de 4 *pools* de blastocistos por grupo foi realizada utilizando o Qiagen RNeasy micro kit (Valencia, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Nessa etapa foi incluído o tratamento com DNase, para eliminação de eventual contaminação por DNA genômico. A eluição foi realizada em um volume de 14 µL. A qualidade do RNA foi avaliada utilizando o Agilent Bioanalyzer 2100 (Santa Clara, CA, USA); com integridade de RNA variando entre 6,90 e 8,60.

A reação de transcriptase reversa (RT) foi realizada com High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (Life Technologies), com a adição (no tubo contendo o RNA tratado com a DNase I), de: 10 µL de RNA extraído, 2 µL de 10X Reverse Transcription Buffer, 0,8 µL de 25X dNTPs, 2 µL de 10X random primers, 1 µL de MultScribe Reverse Transcriptase, 1 µL de RNase inhibitor, 3,2 µL Nuclease-free H₂O. Esta solução foi incubada por 10 minutos à 25°C, seguido de 120 minutos à 37 °C, 5 minutos à 85 °C e finalmente 4 °C. Todas as incubações foram realizadas no termociclador PTC200 DNA Engine Thermal Cycler (MJ Research, CA, EUA). As amostras de cDNA foram mantidas a -20° C até a análise da expressão gênica.

Expressão gênica por qPCR

A análise de expressão gênica em embriões foi realizada utilizando os ensaios TaqMan inventariados (20X, Applied Biosystems). O ensaio possibilitou a aquisição da abundância de mRNA de 47 genes. Baseado nos objetivos deste trabalho foram selecionados 3 genes de interesse: CASP3 (Assay ID: Bt03250956_g1), GPX-1 (Assay ID: Bt03259217_g1) e SOD1 (Assay ID: Bt03215423_g1). Foram utilizados os genes GAPDH (Assay ID: Bt03210913_g1),

ACTB (Assay ID: Bt03279174_g1) e PPIA (Assay ID: Bt03224615_g1) como controles endógenos, os quais estavam incluídos no ensaio.

Anteriormente aos ciclos térmicos do qPCR, cada amostra foi submetida ao processo de pré-amplificação, cada reação foi preparada como se segue: 1,25 µL dos ensaios (ensaio TaqMan foram agrupados e preparados para concentração final de 0,2 X para cada um dos ensaios), 2,5 µL PreAmp TaqMan Master Mix (Applied Biosystems) e 1,25 µL de cDNA. As reações foram ativadas a 95°C durante 10 min, seguido por 14 ciclos das duas etapas de desnaturação a 95°C durante 15 s, e anelamento e extensão a 60°C por 4 minutos. Estes produtos pré-amplificados foram diluídos 5 vezes antes da análise por RT-qPCR.

Para análise de expressão gênica, utilizou-se o sistema de análise microfluídica em larga escala “Biomark HD da Fluidigm®”. Para isso, cada amostra recebeu a preparação (Solução Amostra), que consistia em 2,25 µL do cDNA (produtos pré-amplificado), 2,5 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix (2X, Applied Biosystems) e 0,25 µL de 20X GE Reagente Amostra Loading (Fluidigm); e para cada ensaio, foi preparado outra solução (Solução Ensaio), que consistia em: 2,5 µL do 20X TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) e 2,5 µL de Reagente de Carreamento do Ensaio (2X, Fluidigm®). A análise foi realizada utilizando-se o chip de expressão gênica (Gene Expression – GE) 96.96 Dynamic Array™ Integrated Fluidic Circuits (Fluidigm). Após o condicionamento do chip, cada Solução Amostra foi carregada em um poço do chip (5 µL de cada uma), o mesmo foi feito para cada Solução Ensaio (5 µL de cada um). O ciclo térmico qPCR e detecção foi realizado no Sistema Biomark HD (Fluidigm, South San Francisco, CA, EUA) utilizando o protocolo TaqMan GE 96x96 padrão, que consistia de 5 minutos de ativação da enzima inicial a 95°C, seguido por 40 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão (95°C por 15 s seguido de 60°C durante 60 s).

Todas as análises foram realizadas em duplicata e os valores de Ct foram calculados a partir de software do sistema (Biomark PCR tempo real, Fluidigm). Diferenças na taxa de expressão dos genes foram normalizadas pela frequência de expressão daquele que foi considerado o melhor controle endógeno (GAPDH, PPIA e ACTB). Para selecionar o gene endógeno mais estável, os três genes supracitados tiveram seu padrão de expressão comparados através do software online RefFinder

(XIE *et al.*, 2012), o qual apontou o GAPDH como o gene endógeno mais estável. Para determinar os valores relativos de expressão, a seguinte fórmula foi utilizada: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (amostra alvo)} - \Delta Ct \text{ (amostra calibradora = grupo Controle)}$. Posteriormente, os níveis de expressão relativos dos genes candidatos foram calculados com a expressão $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Fold Change), e então utilizados para a análise estatística e representação gráfica.

Delineamento experimental

COCs (n= 1656) foram maturados em meio TCM-199 suplementado com 10% de SFB. Após a MIV, os oócitos foram fertilizados *in vitro* e os prováveis zigotos foram cultivados em meio SOF suplementado com 2,5% de SFB e 0,5% de BSA (Controle) ou ainda suplementado com 100 μ M de IGF-1 (IGF). Do Dia 6 até o final do CIV, os embriões foram cultivados na presença ou ausência de 5 μ M de menadiona (MD), como se segue: 1) CIV na ausência de MD (Controle); 2) CIV na presença de IGF-1 (IGF); 3) CIV na presença de menadiona (MD); ou 4) CIV na presença de menadiona e de IGF-1 (IGF MD).

No Dia 7 foi avaliado o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos e os mesmos foram destinados às avaliações quanto aos níveis intracelulares de ROS e GSH, atividade de caspases, número total de blastômeros e ocorrência de apoptose, criotolerância e avaliação da expressão de genes-alvo.

Análise estatística

Dentro de cada replicata, um poço da placa de cultivo contendo 50 oócitos foi considerada a unidade experimental para cada grupo. O experimento foi repetido no mínimo 5 vezes, em dias diferentes. A taxa de blastocistos foi calculada considerando o número total de oócitos maturados.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando um efeito estatisticamente significativo foi encontrado, comparações múltiplas das médias foram determinadas pelo teste de Tukey (SAS Programa V.8). As porcentagens foram transformadas utilizando arco-seno raiz quadrada. As variáveis binomiais foram analisadas pelo teste de Qui-Quadrado. Diferenças com probabilidades (P) menores que 0,05 foram consideradas significativas.

3. RESULTADOS

O conteúdo intracelular de GSH em embriões bovinos (Figura 1), expresso em unidades arbitrárias de fluorescência, foi similar ($P>0,05$) em todos os grupos experimentais ($18,1\pm3,93$ a $20,1\pm2,17$).

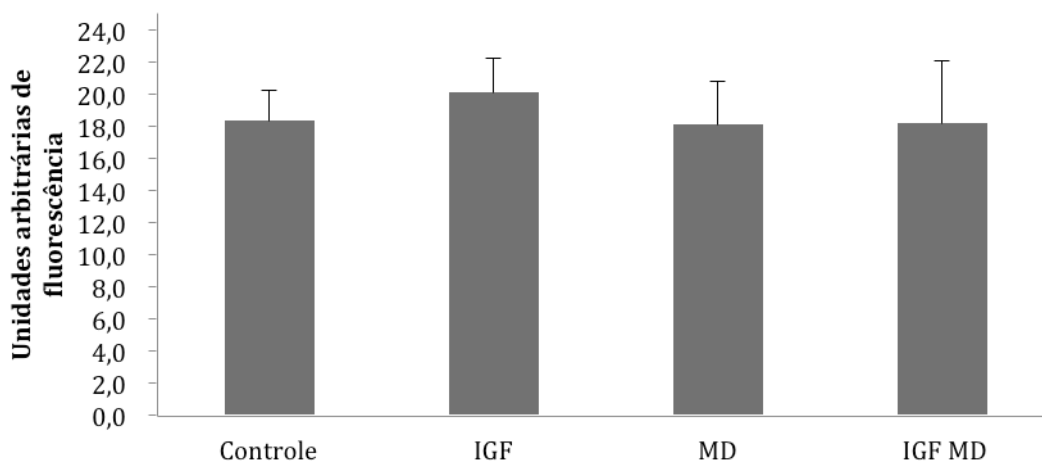


Figura 1. Concentrações intracelulares de GSH (quantificadas em unidades arbitrárias de fluorescência) em embriões produzidos *in vitro* em meio suplementado ou não com IGF-1 e na presença ou ausência de menadiona. Controle = embriões produzidos em meio SOFaa. IGF = embriões produzidos em meio SOFaa suplementado com 100 ng/mL de IGF-1. MD = embriões produzidos em meio SOFaa na presença de 5,0 μ M de MD. IGF MD= embriões produzidos em meio SOFaa suplementado com 100 ng/mL de IGF-1 na presença de 5,0 μ M de MD. Barras com letras distintas diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P<0,05$).

As concentrações intracelulares de ROS (Figura 2) em embriões bovinos, expressas em unidades arbitrárias de fluorescência, foram maiores no grupo MD ($21,7\pm0,71$) que diferiu ($P<0,05$) do grupo Controle ($17,0\pm1,66$). Níveis intermediários de ROS foram encontrados nos grupos IGF ($19,2\pm0,66$) e IGF MD ($18,0\pm1,02$), que não diferiram ($P>0,05$) dos demais grupos (Controle e MD).

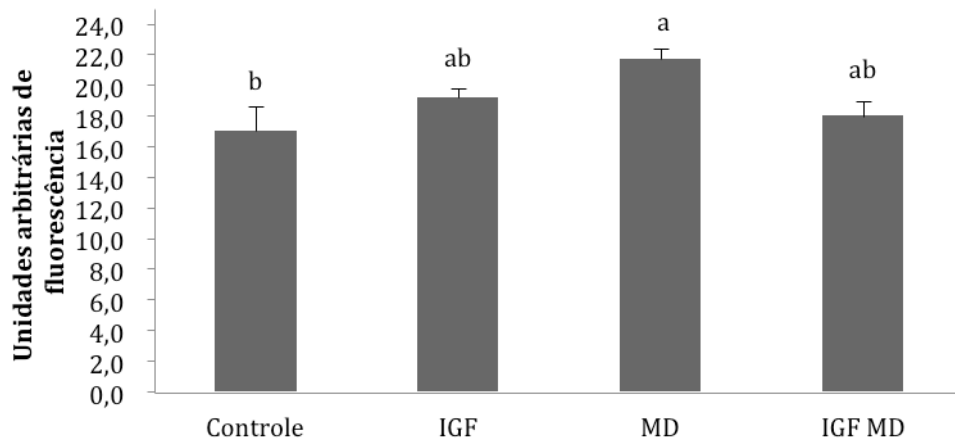


Figura 2. Concentrações intracelulares de ROS (quantificadas em unidades arbitrárias de fluorescência) em embriões produzidos *in vitro* em meio suplementado ou não com IGF-1 e na presença ou ausência de menadiona. Controle = embriões produzidos em meio SOFaa. IGF = embriões produzidos em meio SOFaa suplementado com 100 ng/mL de IGF-1. MD = embriões produzidos em meio SOFaa na presença de 5,0 μ M de MD. IGF MD = embriões produzidos em meio SOFaa suplementado com 100 ng/mL de IGF-1 na presença de 5,0 μ M de MD. Barras com letras distintas diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

A atividade de caspases para os diferentes grupos experimentais está representada na Figura 3, expressa em unidades arbitrárias de fluorescência, e foi similar ($P > 0,05$) em todos os grupos experimentais ($33,7 \pm 3,90$ a $41,1 \pm 3,10$).

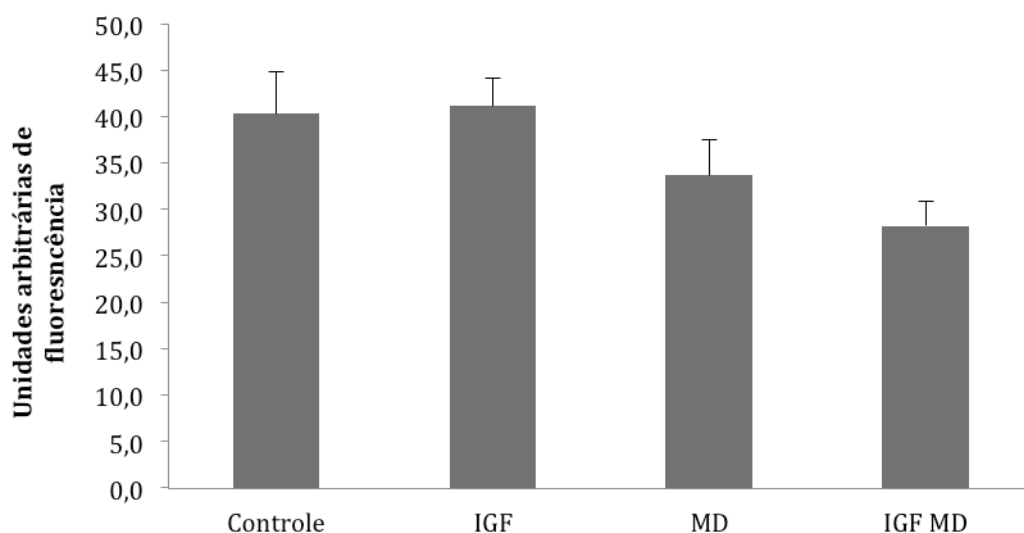


Figura 3. Atividade de caspases 3 e 7 (quantificadas em unidades arbitrárias de fluorescência) de embriões produzidos *in vitro* em meio suplementado ou não com IGF-1 e na presença ou ausência de menadiona. Controle = embriões produzidos em meio SOFaa. IGF = embriões produzidos em meio SOFaa suplementado com 100 ng/mL de IGF-1. MD = embriões produzidos em meio SOFaa na presença de 5,0 μ M de MD. IGF MD= embriões produzidos em meio SOFaa suplementado com 100 ng/mL de IGF-1 na presença de 5,0 μ M de MD. Não houve diferença entre os grupos pelo Teste de Tukey ($P>0,05$).

O número total de células e a porcentagem de células em apoptose estão representados na Tabela 1. Não houve diferença ($P>0,05$) no número total de células entre os grupos experimentais ($66,3\pm2,56$ a $72,7\pm2,04$). As maiores porcentagens de apoptose foram encontradas no grupo MD ($22,3\%\pm1,65$) e foram superiores ($P<0,05$) aos grupos Controle ($12,8\%\pm1,02$), IGF ($9,0\%\pm0,97$) e IGF MD ($15,6\%\pm1,43$). Níveis intermediários de porcentagem de apoptose foram encontrados nos grupos Controle e IGF MD, que não diferiram entre si ($P>0,05$), porém tais grupos foram superiores ($P<0,05$) comparado ao grupo IGF, que apresentou as menores porcentagens comparados aos demais grupos experimentais ($P<0,05$).

Tabela 1. Número total de células e porcentagem de apoptose em embriões produzidos *in vitro* em meio suplementado ou não com IGF-1 e na presença ou ausência de menadiona.

Grupos	N° embriões	Número de células (média ± EPM)	% TUNEL (%média ± EPM)
Controle	57	70,6 ± 1,98	12,8% ± 1,02 ^b
IGF	63	72,7 ± 2,04	9,0% ± 0,97 ^c
MD	22	70,4 ± 3,26	22,3% ± 1,65 ^a
IGF MD	29	66,3 ± 2,56	15,6% ± 1,43 ^b

Número total de células e porcentagem de apoptose em blastocistos produzidos *in vitro* na presença ou ausência de menadiona (MD). Controle = embriões produzidos em meio SOFaa. Controle = embriões produzidos em meio SOFaa. IGF = embriões produzidos em meio SOFaa suplementado com 100 ng/mL de IGF-1. MD = embriões produzidos em meio SOFaa na presença de 5,0 µM de MD. IGF MD = embriões produzidos em meio SOFaa suplementado com 100 ng/mL de IGF-1 na presença de 5,0 µM de MD. Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey (P<0,05).

As taxas de clivagem e blastocistos estão representadas na Figura 4. Não houve diferença (P>0,05) na taxa de clivagem entre os grupos experimentais (79,7%±1,66 a 83,9%±3,72). Já a taxa de blastocistos foi menor (P<0,05) no grupo MD (21,3%±2,93) em relação aos grupos Controle (35,4%±3,41) e IGF (34,5%±3,09), porém o grupo IGF MD (28,3%±3,49) não diferiu dos demais grupos experimentais (P>0,05).

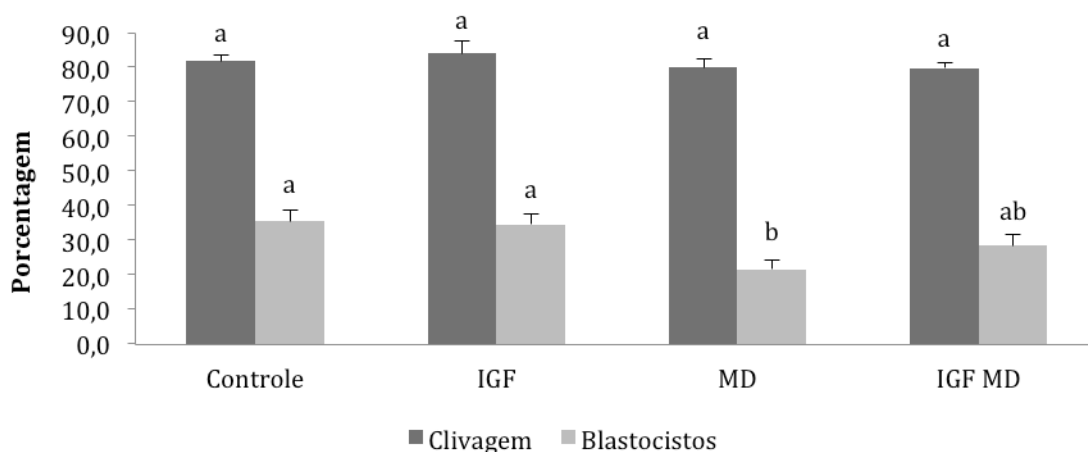


Figura 4. Taxas de clivagem e blastocistos obtidas de embriões bovinos produzidos *in vitro* em meio suplementado ou não com IGF-1 e na presença ou ausência de menadiona. Controle = embriões produzidos em meio SOFaa. IGF = embriões produzidos em meio SOFaa suplementado com 100 ng/mL de IGF-1. MD = embriões produzidos em meio SOFaa na presença de 5,0 µM de MD. IGF MD= embriões produzidos em meio SOFaa suplementado com 100 ng/mL de IGF-1 na presença de 5,0 µM de MD. Barras com letras distintas diferem significativamente pelo Teste de Tukey (P<0,05).

A taxa de re-expansão de blastocistos expandidos após 24 h de recultivo *in*

vitro está representada na Figura 5. A taxa de re-expansão foi menor ($P<0,05$) no grupo MD (49,1%) em relação aos grupos Controle (77,4%) e IGF (69,2%), porém tais grupos não diferiram entre si ($P>0,05$). O grupo IGF MD (57,6%) não diferiu ($P>0,05$) dos grupos IGF e MD, porém foi inferior ($P<0,05$) comparado ao grupo Controle.

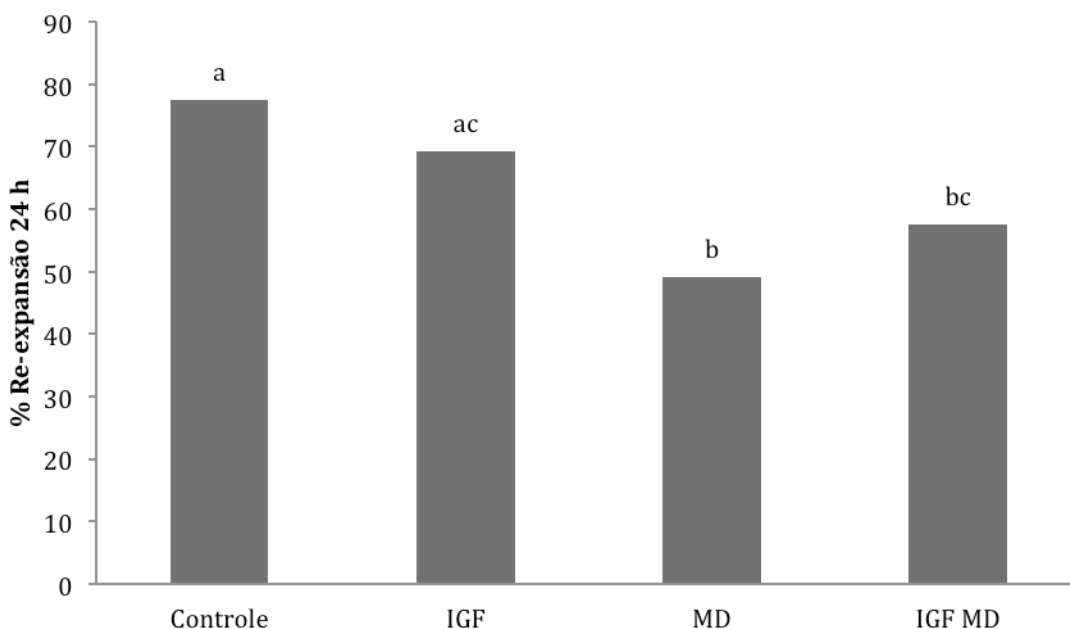


Figura 5. Taxa de re-expansão após 24 h de recultivo de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* em meio suplementado ou não com IGF-1 e na presença ou ausência de menadiona. Controle = embriões produzidos em meio SOFaa. IGF = embriões produzidos em meio SOFaa suplementado com 100ng/mL de IGF-1. MD = embriões produzidos em meio SOFaa na presença de 5,0 μ M de MD. IGF MD= embriões produzidos em meio SOFaa suplementado com 100 ng/mL de IGF-1 na presença de 5,0 μ M de MD. Barras com letras distintas diferem significativamente pelo Teste de Qui-quadrado ($P<0,05$).

Os resultados da expressão gênica estão representados na Figura 6. Não houve diferença ($P>0,05$) na expressão relativa do gene CASP3 entre os grupos experimentais ($0,95\pm0,09$ a $1,42\pm0,21$). De maneira semelhante, a expressão do gene GPX-1 não diferiu ($P>0,05$) entre os grupos ($0,52\pm0,09$ a $1,04\pm0,27$). Já a expressão do gene SOD-1 foi maior ($P<0,05$) no grupo IGF MD ($1,04\pm0,16$) comparado ao grupo IGF ($0,59\pm0,05$), porém estes grupos não diferiram ($P>0,05$) dos grupos Controle ($0,78\pm0,08$) e MD ($0,74\pm0,06$).

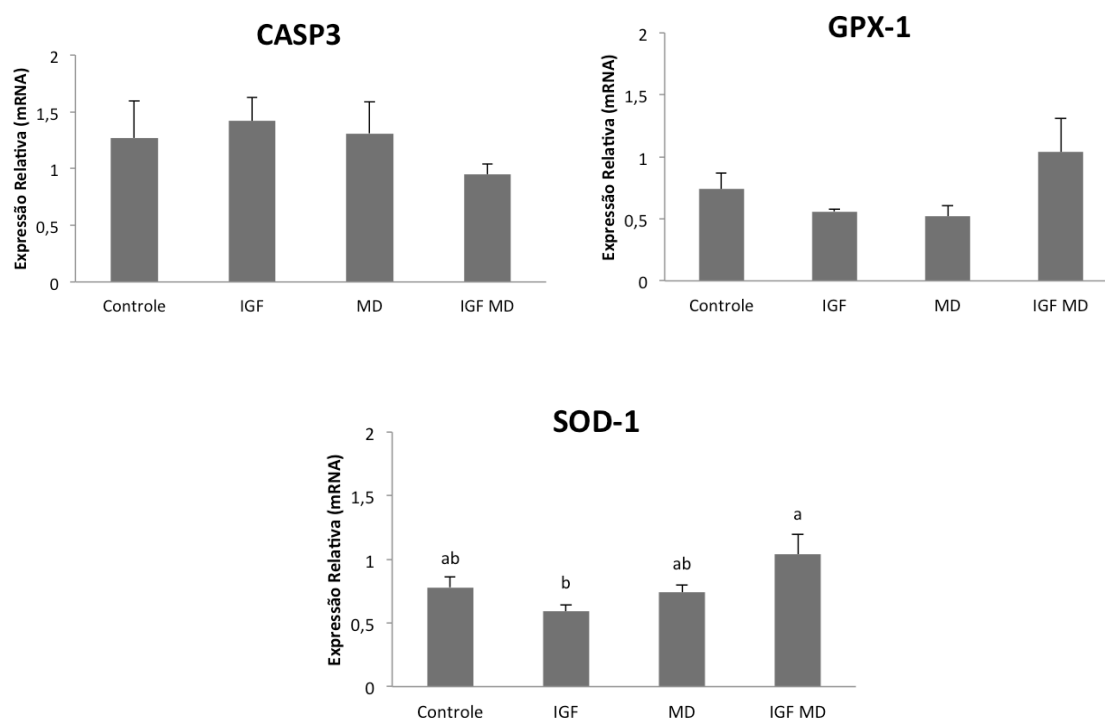


Figura 6. Expressão relativa dos genes caspase 3 (CASP3), glutathiona peroxidase 1 (GPX-1) e superóxido dismutase 1 (SOD-1) em blastocistos bovinos produzidos *in vitro* em meio suplementado ou não com IGF-1 e na presença ou ausência de menadiona. Controle = embriões produzidos em meio SOFaa. IGF = embriões produzidos em meio SOFaa suplementado com 100ng/mL de IGF-1. MD = embriões produzidos em meio SOFaa na presença de 5,0 μ M de MD. IGF MD= embriões produzidos em meio SOFaa suplementado com 100 ng/mL de IGF-1 na presença de 5,0 μ M de MD. Dados apresentados Barras com letras distintas diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Neste estudo foram avaliados os efeitos da suplementação com IGF-1 sobre a aquisição de resistência aos danos decorrentes do estresse oxidativo induzido durante o CIV de embriões bovinos, através da avaliação do conteúdo intracelular de ROS e GSH, atividade de caspases, ocorrência de apoptose, taxa de blastocistos, criotolerância embrionária e expressão de genes-alvo. Os principais resultados aqui relatados sugerem que: 1) o aumento das concentrações intracelulares de ROS e da ocorrência de apoptose, associados à redução do desenvolvimento embrionário *in vitro*, indicam que a adição de 5 μ M de MD durante o CIV gerou uma condição de

estresse oxidativo; (2) a suplementação do meio de CIV com IGF-1 foi capaz de minimizar os efeitos deletérios do estresse oxidativo induzido durante o CIV, ao reverter a ocorrência de apoptose, reduzir parcialmente o acúmulo intracelular de ROS e o impacto sobre o desenvolvimento e criotolerância embrionários; e (3) a adição de IGF-1 durante a CIV foi associada a uma maior aquisição de resistência ao estresse oxidativo induzido pela MD por aumentar a expressão do gene antioxidante SOD-1, e consequentemente, prevenir a ocorrência de apoptose em blastocistos bovinos.

Diversos compostos podem ser utilizados para modular a defesa contra o estresse oxidativo (GUÉRIN *et al.*, 2001). Dentre eles, o fator de crescimento multifuncional IGF-1 atua reduzindo os efeitos do estresse oxidativo (MOSS *et al.*, 2009) e térmico (JOUSAN E HANSEN, 2007) sobre o desenvolvimento embrionário. Neste estudo, os níveis intracelulares de GSH em blastocistos bovinos não foram afetados pela presença de menadiona durante o CIV. De forma semelhante, Feugang *et al.* (2003) relataram que a adição do agente pró-oxidante AAPH, que também induz o aumento da produção das ROS, não afetou o *pool* intracelular de GSH. De acordo com os mesmos autores, apenas a adição do BSO reduziu os níveis intracelulares de GSH, visto que este composto atua inibindo de maneira irreversível a síntese de glutathione. Sabe-se que a proteção contra o estresse oxidativo em embriões bovinos até a transição materno zigótica é determinada primeiramente pelos estoques maternos de antioxidantes nos oócitos (HARVEY *et al.*, 1995). Ainda, blastocistos bovinos do dia 7 do cultivo apresentam níveis reduzidos de GSH quando comparados ao estágio de mórula (FEUGANG *et al.*, 2003). Acredita-se que os reduzidos níveis de GSH em embriões pré-implantacionais seja decorrente principalmente de deficiências na biossíntese da glutathione durante o desenvolvimento embrionário (LIM *et al.*, 1996), o que sugere que existam outros mecanismos de defesa antioxidante, como, por exemplo, antioxidantes de ação enzimática (AMIN *et al.*, 2014).

A adição da menadiona resultou em aumento nos níveis intracelulares de ROS (ASSIS *et al.*, 2015; LOOR *et al.*, 2010), o que era esperado devido à sua ação de promover a redução enzimática de um e dois elétrons, convertendo o O_2 em O_2^- e H_2O_2 , respectivamente (MONKS *et al.*, 1992). Neste contexto, a menadiona têm sido

amplamente utilizada como indutor de estresse oxidativo, utilizando-se como modelo de estudos o embrião bovino (ASSIS *et al.*, 2015). A suplementação com IGF-1, na presença ou ausência de menadiona, não afetou os níveis intracelulares de ROS em embriões bovinos, visto que este fator de crescimento protege os embriões bloqueando os efeitos decorrentes das ROS, mais especificamente a ocorrência de apoptose, e não através da redução da produção das ROS em si (MOSS *et al.*, 2009).

Elevadas concentrações de ROS, decorrentes da adição de menadiona, levaram ao aumento expressivo da porcentagem de células TUNEL-positivas (MOSS *et al.*, 2009), sem no entanto afetar o número total de blastômeros (SIMÕES *et al.*, 2013; BLOCK *et al.*, 2008). De maneira semelhante, a adição dos agentes pró-oxidantes AAPH e BSO promoveram aumento da fragmentação do DNA em embriões bovinos (FEUGANG *et al.*, 2003). Elevadas concentrações de menadiona reduzem o potencial de membrana mitocondrial, com consequente ativação de poros mitocondriais de permeabilidade transitória, levando à redistribuição do citocromo C da mitocôndria para o citoplasma, que, posteriormente, promove danos ao DNA e o início da apoptose (LOOR *et al.*, 2010). Além disso, sabe-se que o acúmulo de superóxido e H₂O₂ em blastocistos parece estar relacionado com maiores taxas de apoptose (MATWEE *et al.*, 2000). A suplementação com IGF-1 durante o CIV reduziu a ocorrência de apoptose em blastocistos bovinos, sem no entanto aumentar o número total de células (BLOCK *et al.*, 2008). Além disso, o IGF-1 reverteu o efeito da adição de 5 µM de menadiona sobre o aumento da apoptose, no entanto em outro relato, o IGF-1 exerceu efeito protetor apenas em concentrações inferiores (1 e 2,5 µM; MOSS *et al.* 2009).

O aumento das ROS induzido pela menadiona não resultou em aumento da atividade de caspases em blastocistos bovinos que sobreviveram aos estresse oxidativo induzido, apesar de apresentarem maior porcentagem de apoptose. O estresse oxidativo durante o tratamento com menadiona foi associado com despolarização mitocondrial e liberação do citocromo C para o citosol, culminando em ativação da caspase 3 e apoptose (LOOR *et al.*, 2010). A adição de um inibidor específico da caspase 3 (Ac-DEVD-CHO) durante a exposição de blastocistos à agentes pró-oxidantes, como AAPH e BSO, preveniram parcialmente o aumento da

fragmentação nuclear, o que sugere que a apoptose seja parcialmente dependente da atividade da caspase 3. Já a adição do inibidor da caspase 3 durante o estágio de mórula não afetou a taxa de blastômeros TUNEL-positivos em blastocistos no dia 7 do cultivo *in vitro*, o que sugere que a fragmentação nuclear em células da massa celular interna (MCI) possa ser caspase-independente (FEUGANG *et al.*, 2003). No entanto, a atividade de caspases e a fragmentação nuclear (TUNEL) não devem ser correlacionadas pois são eventos cronologicamente distintos da via da apoptose, onde o aumento da atividade das caspases ocorre anteriormente à formação dos corpos apoptóticos (VANDAELE *et al.*, 2007). Para que esta correlação pudesse ter sido observada no presente estudo, talvez a abordagem deveria ter sido diferente, podendo ser interessante focar na detecção da atividade de caspases em embriões sobreviventes e não-sobreviventes, ou ainda nas primeiras horas de incubação com a menadiona.

A exposição à agentes pró-oxidantes pode levar ao estabelecimento de duas populações de blastocistos: sobreviventes e não sobreviventes (FEUGANG *et al.*, 2003). Os blastocistos que sobreviveram ao estresse oxidativo induzido pela menadiona não diferiram morfológicamente, como, por exemplo, no número de células e grau de expansão, dos embriões do grupo Controle. No entanto, a indução do estresse oxidativo exerceu efeito negativo sobre a taxa de re-expansão, já que houve aumento da concentração intracelular de ROS e da ocorrência de apoptose. Além disso, esses blastocistos que foram cultivados na presença de menadiona são expostos novamente à condição de estresse oxidativo durante o processo de vitrificação/aquecimento, visto que há um aumento expressivo na produção de ROS durante o processo, resultando em peroxidação lipídica e ruptura da membrana plasmática (KORKONEN *et al.*, 2012) e, consequentemente, redução da sobrevivência embrionária pós-criopreservação. A suplementação com IGF-1 durante o CIV na presença de menadiona reduziu parcialmente o impacto sobre a taxa de re-expansão embrionária. Provavelmente, o aumento da expressão do gene antioxidante SOD-1, verificado nesse grupo experimental, e, consequentemente, da capacidade antioxidante, levou ao aumento da resistência à criopreservação (SALZANO *et al.*, 2014).

A suplementação com IGF-1, em condição de estresse oxidativo, aumentou a expressão do gene antioxidante SOD-1, que atua removendo o ânion superóxido, o que tornou os embriões mais resistentes por aumentar a ativação do sistema antioxidante enzimático embrionário (HARVEY *et al.*, 1995). Ainda, sabe-se que alterações no padrão de expressão de enzimas antioxidantes, como a catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase podem contribuir com a habilidade de desenvolvimento embrionário sob condições de estresse oxidativo (KORKONEN *et al.*, 2012). Sabe-se que as condições de cultivo pós-fertilização aos quais os embriões são expostos podem alterar de maneira drástica o padrão de expressão gênica em blastocistos, que por sua vez, pode culminar em sérias implicações na qualidade embrionária (LONERGAN *et al.*, 2003). No entanto, este é o caso não somente na comparação de embriões obtidos *in vivo* e *in vitro*, mas também dos diferentes sistemas de cultivo estabelecidos na rotina de PIV de embriões bovinos (WRENZYCKI *et al.*, 2001), bem como o estabelecimento da condição de estresse oxidativo *in vitro* (AMIN *et al.*, 2014). A adição da menadiona não alterou o padrão de expressão do gene GPX-1, que atua removendo o H_2O_2 , no entanto existem outros sistemas antioxidantes enzimáticos, como a catalase, que exercem o mesmo papel (GUÉRIN *et al.*, 2001). A maioria dos genes implicados na resposta ao estresse são regulados por alterações no estado redox ou pelos níveis de ROS intracelulares. No entanto, os mecanismos pelos quais as ROS atuam sobre essas vias não estão completamente elucidados (ADLER *et al.*, 1999). A expressão do gene CASP3 não diferiu entre os grupos, o que está em concordância com os achados do presente estudo em que não houve diferença na mensuração da atividade de caspases 3 e 7 nos blastocistos submetidos ou não ao estresse oxidativo. De acordo com relatos presentes na literatura, o padrão de expressão de genes envolvidos na cascata da apoptose, como o BAX (VANDAELE *et al.*, 2007) e a caspase 3, não foi afetado pela origem dos blastocistos (*in vivo* e *in vitro*) ou pelas condições estabelecidas durante o cultivo *in vitro* (KUZMANY *et al.*, 2010; CÁNEPA *et al.*, 2014).

A indução do estresse oxidativo exerceu efeito negativo sobre a taxa de blastocistos (ASSIS *et al.*, 2015; MOSS *et al.*, 2009) e a suplementação com IGF-1 durante o CIV reduziu parcialmente o impacto sobre o desenvolvimento embrionário.

Em outros estudos anteriormente reportados, a concentração de 5 μ M de MD levou à parada do desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocistos (MOSS *et al.*, 2009), o que sugere que essa concentração possa exercer um efeito embriotóxico, visto que embriões pré-implantacionais são muito susceptíveis aos danos decorrentes das ROS (GUÉRIN *et al.*, 2001). Ainda, a adição de agentes pró-oxidantes aumentou a proporção de blastocistos degenerados no dia 8 do cultivo *in vitro*, mas não afetou a transição mórula-blastocistos, o que sugere que blastocistos bovinos são mais sensíveis ao estresse oxidativo comparado com estágios mais iniciais do desenvolvimento embrionário (FEUGANG *et al.*, 2003). O IGF-1 não melhorou o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocistos, no entanto isso não significa que não afete a sobrevivência embrionária em condições de estresse (BLOCK *et al.*, 2008). De maneira semelhante a outros relatos, o estresse oxidativo induzido resultou em redução da qualidade, evidenciado pelo aumento da fragmentação nuclear (MOSS *et al.*, 2009) e bloqueio ou atraso do desenvolvimento até o estágio de blastocistos (ASSIS *et al.*, 2015), possivelmente por afetar de maneira drástica o metabolismo embrionário (TAKAHASHI *et al.*, 2012), visto que as ROS podem levar à despolarização das células do trofoectoderma e inativação na bomba de Na^+/K^+ -ATPase levando à falha na formação da blastocela e degeneração dos blastocistos (FEUGANG *et al.*, 2003).

Com intuito de se adaptarem às perturbações no estado redox, blastocistos bovinos que sobrevivem ao estresse oxidativo apresentam modificações no transcriptoma, porém tais alterações podem comprometer a sinalização celular e culminar em degeneração embrionária ou falha no reconhecimento materno (CAGNONE *et al.*, 2013). Em suma, o estudo dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e diferenciação em embriões pré-implantacionais associado ao aprimoramento das condições de incubação estabelecidas durante o cultivo *in vitro* é fundamental para o sucesso da PIV (TAKAHASHI *et al.*, 2012).

5. CONCLUSÃO

A adição de IGF-1 durante o CIV aumentou a resistência de blastocistos bovinos ao estresse oxidativo induzido pela menadiona, visto que aumentou a expressão do gene antioxidante SOD-1, o que refletiu em redução da apoptose e do impacto sobre o desenvolvimento e criotolerância embrionários.

REFERÊNCIAS

ADLER, V.; Y, Z.; TEW, K.D.; RONAI, Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. **Oncogene**, v. 18, p. 6104-6111, 1999.

AMIN, A.; GAD, A.; SALILEW-WONDIM, D.; PRASTOWO, S.; HELD, E.; HOELKER, M.; RINGS, F.; THOLEN, E.; NEUHOFF, C.; LOOFT, C.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Bovine embryo survival under oxidative-stress conditions is associated with activity of the NRF2-mediates oxidative-stress-response pathway. **Mol. Reprod. Dev.**, v.81, p.497-513, 2014.

ASSIS, P.M.; CASTRO, L.S.; SIQUEIRA, A.F.P.; DELGADO, J.C.; HAMILTON, T.R.S.; GOISSIS, M.D.; MENDES, C.M.; NICHI, M.; VISINTIN, J.A.; ASSUMPÇÃO, M.E.O. System for evaluation of oxidative stress on in-vitro-produced bovine embryos. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 31, p. 577-580, 2015.

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

BAIN, N.T.; MADAN, P.; BETTS, D.H. The early embryo to intracellular reactive oxygen species is developmentally regulated. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.23, p.561-575, 2011.

BLOCK, J; WRENZYCHI, C.; NIEMANN, H.; HERRMANN, D.; HANSEN, P.J. Effects of insulin-like growth factor-1 on cellular and molecular characteristics of bovine blastocysts produced *in vitro*. **Molecular Reprod. and Develop.**, v.75, p.895-903, 2008.

CAGNONE, G.L.M.; SIRARD, M. Transcriptomic signature to oxidative stress exposure at the time of embryonic genome activation in bovine blastocysts. **Mol. Reprod. Dev.**, v.80, p.297-314, 2013.

CÁNEPA, M.J.; ORTEGA, N.M.; MONTELEONE, M.C.; MUCCI, N.; KAISER, G.G.; BROCCO, M.; MUTTO, A. Expression profile of genes as indicators of developmental competence and quality of in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer bovine embryos. **Plos One**, v. 9, p. 1-8, 2014.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C; MOSES, D. F. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. **Biol. Reprod.**, v.57, p.1420-1425, 1997.

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

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

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

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

HARVEY, M.B.; ARCELLANA-PANLILIO, M.Y.; ZHANG, X.; SCHULTZ, G.A.; WATSON, A.J. Expression of genes encoding antioxidants enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures employed for embryo co-cultured. **Biol. Reprod.**, v.53, p.532-572, 1995.

IMAI, K.; MATOBA, S.; DOCHI, O.; SHIMOHIRA, I. Different factors affect developmental competence and cryotolerance in *in vitro* produced bovine embryo. **Theriogenology**, v.64, n.10, p.887-891, 2002.

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

JOUSAN, F.D.; HANSEN, P.J. Insulin-like growth factor-I promotes resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock through actions independent of its anti-apoptotic actions requiring PI3K signaling. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 74, p. 189–196, 2007.

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

KORKONEN, K.; JULKUNEN, K.; BREDBACKA, P.; TIIRIKKA, T.; RÄTY, M.; VARTIA, K.; KAIMIO, I.; KONTINEN, A.; HALMEKYTÖ, M.; VIKKI, J.; PEIPPO, J.; LINDEBERG, H. The effect of ascorbic acid during biopsy and cryopreservation on viability of bovine embryos produced in vivo. **Theriogenology**, v. 77, p. 201-205, 2012.

KURZAWA, R.; GLABOWSKI, W.; BACZKOWSKI, T.; BRELIK, P. Evaluation of mouse preimplantation embryos exposed to oxidative stress cultured with insulin-like growth factor I and II, epidermal growth factor, insulin, transferrin and selenium. **Reprod Biol**, v.2, p.143–162, 2002.

KUZMANY, A.; HAVLICEK, V.; WRENZYCKI, C.; WILKENING, S.; BREM, G.; BESENFELDER, U. Expression of mRNA, before and after freezing, in bovine blastocysts cultures under different conditions. **Theriogenology**, v. 75, p. 482-494, 2011.

LIM, J.M.; LIOU, S.S.; HANSEL, W. Intracytoplasmatic glutathione concentration and the role of beta-mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. **Theriogenology**, v.20, p.407-423, 1996.

LONERGAN, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M.P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 38, p. 259-267, 2003.

LOOR, G.; KONDAPALLI, J.; SCHRIEWER, J.M.; CHANDEL, N.S.; VANDEN HOEK, T.L.; SCHUMACKER, P.T. Menadione triggers cell death through ROS-dependent mechanisms involving PARP activation without apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 1925-1936, 2010.

LOTT, W.M.; ANCHAMPARUTHY, V.M.; MCGILLIARD, M.L.; MULLARKY, I.K.; AND GWAZDAUSKAS, F.C. Influence of cysteine in conjunction with growth factors on the development of *in vitro*-produced bovine embryos. **Reprod. Dom. Anim.**, v.46, p.585-594, 2010.

MATWEE, C.; BETTS, D.; KING, W.A. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote**, v. 8, p. 57-68, 2000.

MONKS, T.J.; HANZLIK, R.P.; COHEN, G.M.; ROSS, D.; GRAHAM, D.G. Quinone chemistry and toxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 112, p.2-16, 1992.

MOSS, J.I.; PONTES, E.; HANSEN, P.J. Insulin-like growth factor-1 protects preimplantation embryos from anti-developmental actions of menadione. **Arch. Toxicol.**, v.83, p.1001-1007, 2009.

NEDAMBALE, T.; DU, F.; YANG, X.; TIAN, X. Higher survival rate of vitrified and thawed *in vitro* produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with beta-mercaptoethanol. **Anim. Reprod. Sci.**, v.93, p.61-75, 2006.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M.A.; FIRST, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biol. Reprod.**, v.38, p.1171-1188, 1988.

SALZANO, A.; ALBERO, G.; ZULLO, G.; NEGLIA, G.; ABDEL-WAHAB, A.; BIFULCO, G.; ZICARELLI, L.; GASPARRINI, B. Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine *in vitro* produced embryos. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 151, p. 91-96, 2014.

SEIDEL, G.E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.228-235, 2006.

SIMÕES, R.; FEITOSA, W.B.; SIQUEIRA, A.F.P.; NICHI, M.; PAULA-LOPES, F.F.; MARQUES, M.G.; PERES, M.A.; BARNABE, V.H.; VISINTIN, J.A.; ASSUMPÇÃO, M.E.O. Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo *in vitro* development outcome. **Reproduction**, v. 146, p.433-441, 2013.

TAKAHASHI, M. Oxidative stress and redox regulation on *in vitro* development of mammalian embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v.58, p.1-9, 2012.

TVRDÁ, E.; KNAZICKÁ, Z.; BÁRDOS, L.; MASSÁNYI, P.; LUKÁČ, N. Impact of oxidative stress on male fertility – a review. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.59, p.465-484, 2011.

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

VANDAELE, L.; MATEUSEN, B.; MAES, D.G.D.; DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Temporal detection of caspase-3 and -7 in bovine *in vitro* produced embryos of diferente developmental capacity. **Reproduction**, v.133, p. 709-718, 2007.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; KESKINTEPE, L.; MARTINS, A. JR., SIRISATHIEN, S.; BRACKETT, B.; NIEMANN, H. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. **Hum Reprod**, v.16, p. 893–901, 2001.

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

XIE, F.; XIAO, P.; CHEN, D.; XU, L.; ZHANG, B. miRDeepFinder: a miRNA analysis for deep sequencing of plant small RNAs. **Plant Mol Biol**, v. 80, p. 75-84, 2012.

CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A adição de antioxidantes intra- e extracelulares durante a maturação *in vitro* ou de IGF-1 durante o cultivo *in vitro* reduziram os efeitos deletérios decorrentes do estresse oxidativo induzido pela menadiona sobre a aquisição de competência para o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocistos.

A incubação com a menadiona, durante o estágio de mórula/blastocistos, resultou em redução no desenvolvimento embrionário *in vitro*. Os blastocistos que sobreviveram ao estresse oxidativo apresentaram maiores concentrações intracelulares de ROS, maior taxa de apoptose, o que refletiu em redução da criotolerância embrionária, apesar de não apresentarem alterações em sua morfologia.

Aprimorar as condições de produção *in vitro* de embriões é um complexo desafio que tem relação com os meios de cultivo utilizados, com as mudanças dinâmicas dos requisitos específicos dos embriões nos diversos estágios de desenvolvimento e com a ocorrência de perturbações no equilíbrio redox. Desta forma, o estudo sistematizado dos efeitos do estresse oxidativo sobre a qualidade, criotolerância e transcriptoma embrionários e o aprimoramento das condições de incubação estabelecidas durante o cultivo são fundamentais para o sucesso da PIV de embriões bovinos.