

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

**OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE TRANSPORTE DE OÓCITOS  
BOVINOS DESTINADOS A PRODUÇÃO *in vitro* DE  
EMBRIÕES**

**Priscila Chediek Dall'Acqua**

Médica Veterinária

2015

**D  
I  
S  
S.**

**/**

**D  
A  
L  
L'  
A  
C  
Q  
U  
A**

**P.  
C.**

**2  
0  
1  
5**

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

**OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE TRANSPORTE DE OÓCITOS  
BOVINOS DESTINADOS A PRODUÇÃO *in vitro* DE  
EMBRIÕES**

**Priscila Chediek Dall'Acqua**

Médica Veterinária

2015

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

**OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE TRANSPORTE DE OÓCITOS  
BOVINOS DESTINADOS A PRODUÇÃO *in vitro* DE  
EMBRIÕES**

**Priscila Chediek Dall'Acqua**

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

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

2015

Dall'Acqua, Priscila Chediek  
D144o Otimização do meio de transporte de oócitos bovinos destinados a  
produção *in vitro* de embriões / Priscila Chediek Dall'Acqua. --  
Jaboticabal, 2015  
x, 71 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015  
Orientadora: Gisele Zoccal Mingoti  
Banca examinadora: Joaquim Mansano Garcia, Cláudia Lima  
Verde Leal  
Bibliografia

1. Inibição da meiose. 2. Maturação *in vitro*. 3. Transporte de  
oócitos. 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:** OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE TRANSPORTE DE OÓCITOS BOVINOS DESTINADOS A PRODUÇÃO *in vitro* DE EMBRIÕES

**AUTORA:** PRISCILA CHEDIEK DALL ' ACQUA

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA , Área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba



Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. CLAUDIA LIMA VERDE LEAL

Universidade de São Paulo / Pirassununga/SP

Data da realização: 03 de fevereiro de 2015.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Priscila Chediek Dall'Acqua – nascida em Araraquara-SP, aos 22 dias do mês de Julho de 1989. Concluiu o ensino médio no *Collegium Sapiens*, na cidade de Araraquara-SP, em dezembro de 2006. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária, na Universidade Estadual do Norte do Paraná – UENP, Câmpus Luiz Meneghel, na cidade de Bandeirantes-PR, em março de 2008. Concluiu o ensino superior em Medicina Veterinária em dezembro de 2012. 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 2013, sob orientação da Profa. Adj. Gisele Zoccal Mingoti, com bolsa de mestrado da Capes. Aprovada no Exame de Seleção para o curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária e área de concentração de Reprodução Animal, nível de Doutorado nesta mesma instituição em outubro de 2014, com início previsto para março de 2015.

## EPÍGRAFE

“É preciso que eu suporte duas ou três larvas  
se quiser conhecer as borboletas.”

Antoine de Saint-Exupéry

## DEDICO

Dedico este trabalho à minha mãe, Sonia, por todo apoio e amor. Ao meu pai, Renan (*in memoriam*), sempre presente em meus pensamentos. À minha avó, Rene, por todo o amor e orações.

## **AGRADECIMENTOS**

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

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

Às minhas amigas e companheiras do laboratório, Beatriz Leão e Nathália Rocha-Frigoni por me acolherem tão bem em Araçatuba, por todos os ensinamentos e ajuda.

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: Anna Cecília Sanches, Juliana Viegas e Luana Rodrigues.

Aos professores componentes da banca examinadora Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia e Profa. Dra. Cláudia Lima Verde Leal pelos ensinamentos e contribuições na defesa.

À minha mãe, avó, tios e primos por todo amor e incentivo.

À minha amiga Fernanda Nunes, pela companhia, amizade desde a faculdade e por me aguentar todos os dias.

Aos meus amigos Marina Cervato, Bruna Bombarda, Luciana Barrancos, Rafaela Storani, Fernanda Antonioli, Bruno Fagioni, Vitor Rossi e Jorge Antunes pela amizade de longa data, incentivo e apoio.

À CAPES 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 mestrado.

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

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

## **APOIO FINANCEIRO**

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

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>1</b>
Introdução.....	1
Revisão de Literatura.....	3
Maturação de oócitos.....	3
Maturação nuclear.....	3
Maturação citoplasmática.....	5
Inibidores da meiose.....	7
Apoptose.....	9
Estresse oxidativo.....	10
Referências.....	12
<b>CAPÍTULO 2 – MATURAÇÃO NUCLEAR E CITOPLASMÁTICA DE OÓCITOS BOVINOS SUBMETIDOS AO TRANSPORTE SIMULADO EM MEIO SUPLEMENTADO COM INIBIDORES DA MEIOSE.....</b>	<b>19</b>
Resumo.....	19
Introdução.....	21
Material e métodos.....	23
Reagentes químicos.....	23
Obtenção e seleção de oócitos.....	23
Simulação de transporte e cultivo de maturação <i>in vitro</i> de oócitos.....	24
Avaliação da maturação nuclear.....	25
Determinação do grau de expansão das células do cumulus.....	25
Avaliação da distribuição dos microfilamentos de actina.....	26

Avaliação da distribuição citoplasmática das mitocôndrias e potencial de membrana mitocondrial.....	26
Mensuração do conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio pelo ensaio com diclorofluoresceína.....	27
Determinação da taxa de apoptose.....	28
Delineamento experimental.....	29
Análise estatística.....	30
Resultados.....	31
Discussão.....	43
Conclusão.....	46
Referências.....	47

<b>CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO A PARTIR DE OÓCITOS BOVINOS TRANSPORTADOS COM INIBIDORES DA MEIOSE E DESTINADOS A PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....</b>	<b>50</b>
Resumo.....	50
Introdução.....	52
Material e métodos.....	54
Reagentes químicos.....	54
Obtenção e seleção de oócitos.....	54
Simulação de transporte e cultivo de maturação <i>in vitro</i> de oócitos.....	54
Fertilização e cultivo embrionário <i>in vitro</i> .....	55
Determinação do número total de células e taxa de apoptose.....	56
Mensuração da atividade das caspases 3 e 7.....	57
Delineamento experimental.....	58
Análise estatística.....	59
Resultados.....	60
Discussão.....	62
Conclusão.....	66
Referências.....	67

<b>CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>71</b>
-----------------------------------------------	-----------

## OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE TRANSPORTE DE OÓCITOS BOVINOS DESTINADOS A PRODUÇÃO *in vitro* DE EMBRIÕES

**RESUMO** – O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da inibição da meiose com inibidores farmacológicos ou biológicos durante o transporte de oócitos bovinos por 6 horas sobre: 1) progressão da maturação nuclear; 2) maturação citoplasmática e 3) competência no desenvolvimento e qualidade dos embriões produzidos. Para tanto, o meio de transporte de oócitos foi suplementado com butirrolactona-I (BL), milrinona (MR), IBMX e forskolina (CL) ou fluido folicular puro (FF) e o meio de maturação somente do grupo transportado com IBMX e forskolina foi suplementado com cilostamida. Os oócitos foram incubados em incubadora portátil (Minitub®) para simulação de transporte, durante 6h. Posteriormente, foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV) até completar 24h e, em seguida, foram fecundados e os prováveis zigotos foram cultivados *in vitro* durante 7 dias. Foram feitos dois grupos controle no experimento I: MIV em 5% de CO<sub>2</sub> em ar por 24h (C1); MIV por 6h na transportadora e mais 18h em 5% de CO<sub>2</sub> em ar (C2). No experimento II foram feitos três grupos controle: MIV com 10% de SFB (Contr SFB); MIV com 0,6% de BSA (Contr BSA); MIV por 6h na transportadora e mais 18h em 5% de CO<sub>2</sub> em ar (Contr Transp) No primeiro experimento foi avaliada a cinética da maturação nuclear após o transporte e durante a MIV, quando também foi avaliada a expansão das células do cumulus. As avaliações da maturação citoplasmática após o transporte e ao final da MIV foram feitas pelos seguintes parâmetros: avaliação do posicionamento de mitocôndrias, do potencial de membrana mitocondrial, do posicionamento dos microfilamentos de actina, da taxa de apoptose e do conteúdo intracelular de espécies reativas do oxigênio. No experimento 2, foi feita a avaliação da taxa de clivagem (72 hpi) e do desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos (168 hpi), sendo que a qualidade dos embriões foi avaliada pela contagem do número total de células e taxa de apoptose, assim como pela determinação da atividade das caspases. No experimento 1, a taxa de oócitos em metáfase II após 24h de MIV não foi afetada ( $P>0,05$ ) pelos tratamentos (61,2%-74,7%). A expansão das células do cumulus foi maior ( $P<0,05$ ) no grupo FF após as 6h e não diferiu entre os grupos ao final da MIV (4,8%-5,0%). A distribuição dos microfilamentos de actina na categoria difusa (37,4%) foi maior ( $P<0,05$ ) após 6h de MIV no grupo MR quando comparado aos oócitos imaturos (6,4%) e ao grupo FF (8,1%), porém foi predominante na categoria normal e não diferiu ( $P>0,05$ ) entre os grupos ao final da MIV (65,5%-84,2%). A distribuição citoplasmática de mitocôndrias foi predominantemente periférica (47,8%-73,3%) em oócitos imaturos e dispersa (77,7%-89,0%) após a MIV. O potencial de membrana mitocondrial foi semelhante ( $P>0,05$ ) entre os grupos (148,3-168,1) após 6h e 24h de MIV os oócitos dos grupos C1 (231,9) e C2 (219,8) apresentaram maior ( $P<0,05$ ) potencial de membrana mitocondrial quando comparados aos grupos MR (155,2) e FF (161,9), porém não diferiram de BL (189,5). A quantidade intracelular de ROS após 6h foi menor ( $P<0,05$ ) no grupo BL (141,9) comparado com MR (160,8) e ambos foram semelhantes ( $P>0,05$ ) aos demais tratamentos (145,8-153,7). A taxa de apoptose em oócitos imaturos (1,5%) e após o transporte (6h) no grupo C1 (1,3%) foi menor ( $P<0,05$ ) quando comparados com MR (13,8%) e C2 (12,0%) e não diferiram ( $P>0,05$ ) de BL (7,5%), CL (7,8%) e FF (7,1%), não houve diferença ( $P>0,05$ ) na

taxa de apoptose em oócitos maduros (2,3%-8,8%). No experimento 2, a taxa de clivagem foi maior ( $P < 0,05$ ) para o grupo Contr SFB (84,5%) quando comparada aos demais (59,6%-70,9%). O desenvolvimento embrionário do grupo Contr SFB (39,8%) foi maior ( $P < 0,05$ ) quando comparado a Contr Transp (22,6%) e MR (21,6%) e todos estes foram semelhantes ( $P > 0,05$ ) aos demais (23,6%-28,7%). O número total de células em embriões do grupo Contr SFB (85,2) foi maior ( $P < 0,05$ ) do que os dos grupos Contr BSA (53,6), Contr Transp (55,5), BL (58,3), CL (57,9) e MR (59,1), e todos foram semelhantes ( $P > 0,05$ ) ao grupo FF (67,7). A taxa de apoptose avaliada pelo ensaio TUNEL não diferiu ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos (12,3%-15,7%), assim como a atividade das caspases que não apresentou diferença ( $P > 0,05$ ) entre os grupos experimentais (139,0-152,4). A adição de inibidores da meiose (butirolactona-I, IBMX associado à forskolina e fluido folicular), com exceção da milrinona, ao meio de transporte de oócitos bovinos permite um transporte adequado por 6h, preservando a qualidade e integridade dos oócitos, permitindo uma produção embrionária semelhante à obtida *in vitro* a partir de oócitos que não foram submetidos ao transporte.

**Palavras-chave:** inibição da meiose, maturação *in vitro*, transporte de oócitos

## IMPROVEMENT OF OOCYTE TRANSPORTATION CULTURE MEDIA FOR THE PURPOSES OF *in vitro* PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS

**ABSTRACT** – The aim of this trial was to evaluate the effects of meiotic inhibition with biological and pharmacological inhibitors during transportation of bovine oocytes for 6 hours in: 1) nuclear maturation progress; 2) cytoplasmic maturation and 3) embryo development and quality. Thus, the transportation media were supplemented with butyrolactone-I, milrinone, IBMX and forskolin or follicular fluid. Oocytes were transported during 6 hours and then submitted to *in vitro* maturation (IVM) until completing 24 hours, then they were fertilized and the presumptive zygotes cultured during 7 days. There were made two control groups in the first experiment: 24h IVM in 5% CO<sub>2</sub> in air (C1); 6h IVM in transport and 18h more in 5% CO<sub>2</sub> in air (C2). In the second experiment there were made three control groups: IVM with 10% FCS (Contr FCS); IVM with 0,6% BSA (Contr BSA); 6h IVM in transport and 18h more in 5% CO<sub>2</sub> in air (Contr Transp). Experiment 1 evaluated nuclear maturation kinetics and cumulus cell expansion. Cytoplasmic maturation was also evaluated after transport and after IVM through the evaluation of mitochondria position and membrane potential, actin microfilaments distribution. Apoptotic rates and intracellular measurement of reactive oxygen species were evaluated as well. Experiment 2 evaluated cleavage (72 hpi) and blastocyst (168 hpi) rates and embryo quality by total cell number, apoptosis and caspases activity. In experiment 1 no differences ( $P>0.05$ ) were observed between treatments in metaphase II rates after 24h IVM (61.2%-74.7%). Cumulus cells expansion was higher ( $P<0.05$ ) in FF group after 6h and there were no differences ( $P>0.05$ ) between treatments after IVM (4.8-5.0). Actin microfilaments distribution was higher ( $P<0.05$ ) in MR group for diffuse category (37.4%) after 6h IVM when compared to immature (6.4%) and FF groups (8.1%), but it was predominantly in normal category and did not differ ( $P>0.05$ ) between groups after IVM (65.5%-84.2%). Mitochondrial cytoplasmic distribution was mostly peripheral (47.8%-73.3%) in immature oocytes and disperse (77.7%-89.0%) after IVM. There were no differences ( $P>0.05$ ) in mitochondrial membrane potential after 6h (148.3-168.1) and after IVM it was higher ( $P<0.05$ ) in C1 (231.9) and C2 (219.8) when compared to MR (155.2) and FF (161.9), but did not differ ( $P>0.05$ ) from BL (189.5). Intracellular amounts of ROS after 6h was lower ( $P<0.05$ ) in BL (141.9) than in MR (160.8) and both were similar ( $P>0.05$ ) to the others. Apoptosis rate in immature oocytes (1.5%) and after 6h in C1 (1.3%) was lower ( $P<0.05$ ) than MR (13.8%) and C2 (12.0%) and did not differ ( $P>0.05$ ) from BL (7.5%), CL (7.8%) and FF (7.1%). In mature oocytes, there were no differences ( $P>0.05$ ) in apoptosis rates. In experiment 2, cleavage rates was higher ( $P>0.05$ ) for Contr FCS group (84.5%) when compared to the others (59.6%-70.9%). Embryo development was higher ( $P<0.05$ ) in Contr FCS (39.8%) in comparison to Contr Transp (22.6%) and MR (21.6%), and those were similar ( $P>0.05$ ) to the others (23.6%-28.7%). Total cell number in embryos from the group Contr SFB (85.2%) was higher ( $P<0.05$ ) than Contr BSA (53.6%), Contr Transp (55.5%), BL (58.3%), CL (57.9%) and MR (59.1%), and they did not differ from FF (67.7%). TUNEL evaluation of apoptosis did not differ ( $P>0.05$ ) between treatments (12.3%-15.7%), and the caspases activity (139.0-152.4) did not differ ( $P>0.05$ ). The addition of meiotic inhibitors (butyrolactone-I, IBMX associated to forskolin and follicular fluid), with exception of milrinone, for the

transport medium of bovine oocytes allows an adequate transport for 6h, preserving the quality and integrity of oocytes, promoting an embryo production similar to that obtained *in vitro* by oocytes that were not submitted to transport.

**Keywords:** meiotic inhibition, *in vitro* maturation, oocyte transportation

## LISTA DE ABREVIATURAS

**A** – ausente

**A I** – anáfase I

**AMPc** – monofosfato de adenosina cíclica

**ANOVA** – análise de variância

**ATP** – adenosina trifosfato

**BL** – butirolactona-I

**BSA** – albumina sérica bovina

**CDK** – ciclinas dependente de cinases

**CL** – cilostamida

**CO<sub>2</sub>** – gás carbônico

**DC** – descontínua

**DF** – difusa

**EPM** – erro padrão da média

**FF** – fluido folicular

**FIV** – fertilização *in vitro*

**FLICA** - *Image iT LIVE Red Caspase-3 and -7 Detection Kit*

**FSH** – hormônio folículo estimulante

**GSH** – glutationa

**GVBD** – quebra da vesícula germinativa

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

**hCG** – gonadotrofina coriônica equina

**hpi** – horas pós-inseminação

**IBMX** – 3-isobutil-1-metilxantina

**LH** – hormônio luteinizante

**nm** - nanômetros

**MAPK** – proteína cinase ativada por mitógenos

**MI** – metáfase I

**MII** – metáfase II

**MIV** – maturação *in vitro*

**MPF** – fator promotor de maturação

**MR** – milrinona

**N** – normal

**OPU** – *ovum pick up*

**PDE** – fosfodiesterases

**PHE** – penicilamina, hipotaurina e epinefrina

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

**PKA** – proteína cinase A

**ROS** – espécies reativas do oxigênio

**SFB** – soro fetal bovino

**SOF** – *synthetic oviduct fluid*

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

**TALP-FIV** – meio de fecundação

**TI** – telófase I

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

**VG** – vesícula germinativa

**μM** - micromolar

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>CAPÍTULO 2 – MATURAÇÃO NUCLEAR E CITOPLASMÁTICA DE OÓCITOS BOVINOS SUBMETIDOS AO TRANSPORTE SIMULADO EM MEIO SUPLEMENTADO COM INIBIDORES DA MEIOSE</b>	
<b>Tabela 1</b> - Distribuição dos microfilamentos de actina em oócitos bovinos imaturos (0h: imediatamente após remoção do folículo ovariano) e em oócitos cultivados com inibidores da meiose durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação <i>in vitro</i> por até mais 18 horas, em meio livre de inibidor.....	37
 <b>CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO A PARTIR DE OÓCITOS BOVINOS TRANSPORTADOS COM INIBIDORES DA MEIOSE E DESTINADOS A PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES</b>	
<b>Tabela 1</b> - Clivagem, desenvolvimento embrionário e número total de células de embriões bovinos produzidos a partir de oócitos cultivados com inibidores da meiose durante o transporte por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação <i>in vitro</i> por 18 horas adicionais, em meio livre de inibidor.....	60

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>CAPÍTULO 2 – MATURAÇÃO NUCLEAR E CITOPLASMÁTICA DE OÓCITOS BOVINOS SUBMETIDOS AO TRANSPORTE SIMULADO EM MEIO SUPLEMENTADO COM INIBIDORES DA MEIOSE</b>	
<b>Figura 1</b> - Imagem ilustrativa de oócito bovino corado com a sonda fluorescente Hoechst 33342 para identificação dos núcleos (em azul). Os oócitos foram avaliados em microscopia de epifluorescência (excitação 404 nm e emissão 526 nm; aumento 20 vezes).....	25
<b>Figura 2</b> - Imagem ilustrativa de oócitos bovinos corados com a sonda fluorescente faloidina conjugada com FITC e avaliados em microscopia de epifluorescência (excitação 495 nm e emissão 517 nm; aumento 20 vezes).....	26
<b>Figura 3</b> - Imagem ilustrativa de oócitos bovinos corados com a sonda fluorescente MitoTracker Red® e avaliados em microscopia de epifluorescência (excitação 579 nm e emissão 599 nm; aumento de 20 vezes).....	27
<b>Figura 4</b> - Imagem ilustrativa de oócitos bovinos corados com a sonda fluorescente H <sub>2</sub> DCFDA e avaliados em microscopia de epifluorescência (excitação 495 nm e emissão 520 nm; aumento de 20 vezes).....	28
<b>Figura 5</b> - Imagem ilustrativa de oócito bovino corado com a sonda fluorescente Hoechst 33342 para identificação do material nuclear (em azul, A) e TUNEL para determinação da fragmentação nuclear (em verde, B) e avaliados em microscopia de epifluorescência (excitação 510-550 nm e emissão 590 nm; aumento de 20 vezes).....	29
<b>Figura 6</b> - Esquema representativo do delineamento experimental completo.....	30
<b>Figura 7</b> - Taxa de oócitos em vesícula germinativa (VG) durante a maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos cultivados com inibidores da meiose durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação <i>in vitro</i> por até mais 18 horas, em meio livre de inibidor.....	32
<b>Figura 8</b> - Taxa de oócitos em estádios intermediários da meiose (GVBD, MI, A/T) durante a maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos cultivados com inibidores da meiose	

durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por até mais 18 horas, em meio livre de inibidor.....33

**Figura 9** - Taxa de oócitos em metáfase II (MII) durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos cultivados com inibidores da meiose durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por até mais 18 horas, em meio livre de inibidor.....34

**Figura 10** - Escore de expansão das células do cumulus de oócitos bovinos cultivados com inibidores da meiose durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por até mais 18 horas, em meio livre de inibidor.....35

**Figura 11** - Distribuição citoplasmática de mitocôndrias em oócitos bovinos cultivados com inibidores da meiose durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por mais 18 horas, em meio livre de inibidor.....38

**Figura 12** - Potencial de membrana mitocondrial (quantificado em intensidade de fluorescência) de oócitos bovinos cultivados com inibidores da meiose durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por mais 18 horas, em meio livre de inibidor.....39

**Figura 13** - Concentrações intracelulares de espécies reativas do oxigênio (ROS) em oócitos bovinos cultivados com inibidores da meiose durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por mais 18 horas, em meio livre de inibidor.....41

**Figura 14** - Taxa de apoptose em oócitos bovinos cultivados com inibidores da meiose durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por mais 18 horas, em meio livre de inibidor.....42

### **CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO A PARTIR DE OÓCITOS BOVINOS TRANSPORTADOS COM INIBIDORES DA MEIOSE E DESTINADOS A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES**

**Figura 1** - Imagem ilustrativa de embrião bovino corado com a sonda fluorescente Hoechst 33342 para identificação dos núcleos e contagem do número total de células (em azul, A) e TUNEL para determinação das células em apoptose (em

verde, B). Sobreposição das imagens em (C). Os embriões foram avaliados em microscopia de epifluorescência (excitação 510-550 nm e emissão 590 nm, aumento 20X).....	57
<b>Figura 2</b> - Imagem ilustrativa de embriões bovinos corados com a sonda fluorescente FLICA <sup>®</sup> e avaliados em microscopia de epifluorescência (excitação 510-550 nm e emissão 590 nm, aumento 20X).....	58
<b>Figura 3</b> - Esquema representativo do delineamento experimental completo.....	59
<b>Figura 4</b> - Taxa de apoptose em embriões bovinos produzidos a partir de oócitos cultivados com inibidores da meiose durante o transporte por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação <i>in vitro</i> por 18 horas adicionais, em meio livre de inibidor.....	61
<b>Figura 5</b> - Atividade das caspases 3 e 7 em embriões bovinos produzidos a partir de oócitos cultivados com inibidores da meiose durante o transporte por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação <i>in vitro</i> por 18 horas adicionais, em meio livre de inibidor.....	62

## CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

### 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da técnica de punção folicular guiada por ultrassonografia (*ovum pick up* – OPU) permitiu a obtenção de oócitos de qualidade de animais previamente selecionados para programas de produção *in vitro* de embriões (PIV), abrindo novos caminhos para multiplicação de animais de interesse econômico e melhorando as taxas de transferência de embrião, no que diz respeito ao número de bezerro/vaca/ano (PEIXER, 2000; DENIS, 2008). Nesse caso, oócitos obtidos a campo são transportados em incubadora portátil, sem controle de atmosfera gasosa, na qual se inicia o processo de maturação *in vitro* (MIV) durante sua jornada até o laboratório. Devido a isso, o transporte do oócito na incubadora portátil requer condições de cultura similares aos padrões de incubação com controle da atmosfera, todavia, essa condição ideal só é conseguida apenas por algumas horas e o cultivo em ar atmosférico pode ocasionar vários danos aos oócitos, o que pode comprometer sua viabilidade (CHEN et al., 2005). Por isso, a forma de transporte de oócitos e os possíveis danos causados a eles devem ser investigados.

A MIV de oócitos não apresenta a mesma eficiência quando comparada a que ocorre *in vivo*. Entretanto, é uma das fases mais importantes da PIV, pois é nesse período que o oócito termina de adquirir capacidade de ser adequadamente fertilizado e prosseguir o desenvolvimento embrionário. Pois, a maturação oocitária é necessária para que ocorra o bloqueio à polispermia e a formação do pró-núcleo após a fertilização, isso ocorre pela redistribuição das organelas citoplasmáticas durante esse período (HURK; ZHAO, 2005). A maturação oocitária envolve as etapas de maturação nuclear, maturação citoplasmática e maturação molecular. Nesta fase o oócito armazena mRNAs, proteínas e fatores de transcrição (FERREIRA et al., 2009) necessários para manter o desenvolvimento inicial do embrião até a transição materno-zigótica (ativação dos genes do embrião).

Indubitavelmente, muitos fatores biológicos agem de forma conjunta para preparar o oócito imaturo para o desenvolvimento bem sucedido a um embrião depois da fecundação. Alterações na maturação oocitária podem ser causadas por inadequada maturação nuclear ou citoplasmática, ou mesmo por falha em ambas (YANG et al., 1998). Várias alternativas vêm sendo pesquisadas para melhorar a competência de desenvolvimento dos oócitos *in vitro* como, por exemplo, o uso de inibidores da meiose.

A inibição da meiose antes da maturação é uma ferramenta importante no estudo dos possíveis fatores envolvidos na indução da capacitação oocitária após a remoção dos oócitos do ambiente folicular, já que após a retirada destes do folículo a maturação nuclear (retomada da meiose) é iniciada, mas nem sempre o oócito passou por todas as transformações necessárias para suportar a fecundação e o desenvolvimento embrionário, pois a completa maturação citoplasmática pode não ter ocorrido. Isto porque, *in vivo* o reinício da meiose é resultado do estímulo gonadotrófico próximo da ovulação (HURK; ZHAO, 2005), o que promove modificações em moléculas reguladoras da meiose e causa fosforilações proteicas mediadas por proteínas cinases e desfosforilações mediadas por fosfatases (WEHREND; MEINECKE, 2001). Entretanto, *in vitro*, a remoção do oócito do folículo ovariano pelo procedimento de aspiração folicular, estimula a retomada precoce da meiose (BLONDIN et al., 1997), o que pode alterar a capacitação oocitária. Assim, sugere-se o uso de inibidores da meiose por um período prévio a maturação, de forma que essa capacitação seja completa ao término do processo (HENDRIKSEN et al., 2000). Essa alternativa pode permitir melhor controle da maturação do oócito e ter efeitos positivos sobre o desenvolvimento embrionário subsequente.

O estabelecimento de um sistema que melhore a qualidade da maturação do oócito bovino é essencial para a melhoria da PIV, principalmente, quando os oócitos são obtidos em fazendas ou centrais de doadoras localizadas a grandes distâncias dos laboratórios. Com este intuito, este trabalho busca acrescentar informações referentes às condições de transporte e sincronização da maturação nuclear e citoplasmática para a adequada maturação do oócito bovino. Desta forma, nesse estudo utilizaremos inibidores biológicos e farmacológicos da meiose e avaliar seus efeitos durante o transporte de oócitos bovinos destinados à PIV.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Maturação de oócitos

Maturação oocitária é o processo no qual o oócito completa a primeira divisão meiótica e progride até a fase de metáfase II (MII), ao mesmo tempo em que ocorrem alterações na disposição de organelas citoplasmáticas (MEHLMANN, 2005). A maturação envolve alterações nucleares, citoplasmáticas e moleculares, que são eventos relativamente independentes entre si e que garantem a capacitação do oócito para expressar seu potencial após a fecundação (FERREIRA et al., 2009).

A capacidade do oócito retomar a meiose e se tornar maturo, denominada competência meiótica ocorre durante a foliculogênese e coincide com a formação do antro folicular, no entanto, a competência meiótica não indica a competência oocitária, pois a maturação citoplasmática pode não estar completa (SÁNCHEZ; SMITZ, 2012). A maturação citoplasmática inclui a reorganização de organelas celulares, a migração das mitocôndrias para próximo do núcleo e o acúmulo de grânulos corticais sob o oolema (HURK; ZHAO, 2005). Ainda, é necessária para que o oócito tenha condições de bloquear a polispermia e formar os pró-núcleos após a fertilização.

#### 2.1.1 Maturação nuclear

A maturação nuclear de oócitos envolve a progressão (retomada) da meiose a partir da fase de prófase I, no estágio de diplóteno, progredindo até MII, quando ocorre outro bloqueio que se estende até a fertilização (MOTLIK et al., 1998; HURK; ZHAO, 2005).

A redução meiótica garante que o gameta receba metade do número de cromossomos presentes nas células somáticas, sendo a citocinese assimétrica, o oócito se divide em uma grande célula haploide e dois corpúsculos polares (LI et al., 2005).

*In vivo*, o início da maturação ocorre antes da ovulação, quando o oócito em prófase I retoma a meiose pelo estímulo do hormônio luteinizante (LH), mas em procedimentos *in vitro* a retomada da meiose pode ocorrer independente da

presença dessa gonadotrofina, ou seja, de forma espontânea após a remoção do oócito do ambiente folicular (BILODEAU-GOESEELS, 2011).

Após o pico endócrino de secreção de LH, as células do cumulus se expandem devido à produção de ácido hialurônico (SÁNCHEZ; SMITZ, 2012), ocasionando o fechamento das junções GAP que fazem a comunicação entre o oócito e as células do cumulus, culminando na condensação da cromatina (LODDE et al., 2013).

O ambiente folicular é responsável pelo bloqueio e pela retomada da meiose (GILCHRIST, 2011) que é controlado pelos níveis intraocitários de monofosfato de adenosina cíclica (AMPc). O AMPc pode ser produzido pelo oócito ou pelas células foliculares ao redor dele (MEHLMANN, 2005), é sintetizado pela adenilato ciclase (BILODEAU-GOESEELS, 2011) e transferido das células foliculares para o interior do oócito através das junções do tipo GAP, responsáveis pelo controle da maturação (DEKEL, 2005). As fosfodiesterases (PDE) são responsáveis pela degradação do AMPc (SASSEVILLE et al., 2009).

As células foliculares mantêm o oócito em prófase I (MEHLMANN, 2005) pelos altos níveis de AMPc no interior do oócito, que por sua vez suprimem a atividade do fator promotor de maturação (MPF) por estimular a proteína cinase A (PKA) e, a retomada da meiose é devida ao decréscimo dos níveis de AMPc (DEKEL, 2005; GILCHRIST, 2011).

Os altos níveis de AMPc no oócito mantêm a PKA ativa e a ciclina dependente de cinase (CDK) fosforilada e inativa (BILODEAU-GOESEELS, 2011). A diminuição das concentrações intraocitárias de AMPc reduz a atividade catalítica da PKA, permitindo a ativação da cdc25, desfosforilação das CDK 1 na treonina 14 e tirosina 15 e o fator promotor de maturação (MPF) fica ativo (MEHLMANN, 2005; BILODEAU-GOESEELS, 2011). Essas alterações permitirão a ruptura da vesícula germinativa, condensação dos cromossomos e formação do fuso meiótico (DEKEL, 2005). A queda do AMPc também envolve a ativação da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK), uma outra cinase envolvida na maturação oocitária (DEKEL, 2005; HURK; ZHAO, 2005). Na indução da maturação pelo hormônio folículo estimulante (FSH) ela é importante (LI et al., 2012). A MAPK é regulada pela

proteína MOS e sua inibição não impede o oócito de completar a primeira divisão meiótica, porém dificulta o bloqueio em MII (DEKEL, 2005).

O MPF é uma proteína formada por uma ciclina B, a subunidade regulatória e pela cinase p34<sub>cdc2</sub>, a subunidade catalítica (HURK; ZHAO, 2005). A ciclina B regula a atividade do MPF e o estado de fosforilação da cinase p34<sub>cdc2</sub> a qual é uma CDK 1 que determina quando o MPF assume sua forma ativa ou inativa (MERMILLOD et al., 2000; KNOCKAERT et al., 2002). O MPF ativo é capaz de fosforilar as proteínas que formam o envelope nuclear e as envolvidas na condensação da cromatina e reorganização do citoesqueleto (HURK; ZHAO, 2005). A atividade do MPF é elevada imediatamente após a retomada da meiose, antes da quebra da vesícula germinativa (GVBD), é máxima em metáfase I (MI) e cai antes da formação do primeiro corpúsculo polar, voltando a aumentar antes de iniciar a segunda divisão meiótica (DEKEL, 2005).

O oócito bloqueado em prófase I é caracterizado pela estrutura nuclear chamada de vesícula germinativa (VG). Com a retomada da meiose ocorre a GVBD, os cromossomos se condensam e a placa da MI se forma, completando a primeira divisão meiótica, com a segregação dos cromossomos homólogos entre o oócito e o primeiro corpúsculo polar; subsequentemente, há a formação da placa da MII (DEKEL, 2005). A extrusão do primeiro corpúsculo polar indica o fim da meiose I e o oócito fica bloqueado em MII. Com a fecundação ou através de ativação partenogenética tem início a meiose II que termina com a extrusão do segundo corpúsculo polar (LI et al., 2005).

Em um estudo da cinética da maturação nuclear durante a MIV, LI et al. (2005) reportaram que a GVBD se inicia após 6h e é completa após 8h, a MI ocorre com 14h e a MII é atingida na maioria dos oócitos ao redor de 20h.

### **2.1.2 Maturação citoplasmática**

A maturação citoplasmática envolve a redistribuição das organelas citoplasmáticas (mitocôndrias, ribossomos, retículo endoplasmático liso e rugoso, grânulos corticais e complexo de Golgi), a dinâmica dos filamentos do citoesqueleto e a maturação molecular (FERREIRA et al., 2009).

Os eventos que ocorrem durante a maturação citoplasmática consomem energia e, por isso, o movimento das mitocôndrias para áreas de alto consumo de energia é imprescindível (MAO et al., 2014).

As mitocôndrias são organelas responsáveis pela produção de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) pela fosforilação oxidativa (CUMMINS, 2004; TARAZONA et al., 2006; MAO et al., 2014). Em oócitos imaturos as mitocôndrias estão dispostas na região periférica do citoplasma e, após a maturação a distribuição se torna mais central, podendo estar dispostas na forma de “clusters” ao redor de vacúolos citoplasmáticos e gotas de lipídios (STOJKOVIC et al., 2001). Existe uma relação entre a formação de “cluster” mitocondrial e a produção de ATP, sendo a reorganização das mitocôndrias e a produção de ATP dependentes da competência oocitária, nos oócitos mais competentes há maior formação de cluster e produção de ATP durante toda a maturação (JESETA et al., 2014).

A relação entre a atividade e a distribuição das mitocôndrias assim como a quantidade de ATP antes da ativação do genoma são fatores essenciais para determinar a competência do embrião bovino (TARAZONA et al., 2006).

O potencial de membrana mitocondrial indica a atividade metabólica dessa organela, bem como a funcionalidade da cadeia respiratória na geração de ATP, visto que resulta da transferência de íons hidrogênio através da membrana interna durante o transporte de elétrons e fosforilação oxidativa (HUA et al., 2012). Mudanças na atividade mitocondrial durante a maturação estão relacionadas com a competência oocitária, sendo que em oócitos competentes ela aumenta duas vezes antes da retomada da meiose e antes do final da maturação, enquanto que em oócitos menos competentes só é aumentada significativamente uma vez antes do fim da maturação (JESETA et al., 2014).

A atividade mitocondrial está presente somente em alguns oócitos imaturos e, após a maturação, ela aumenta, provavelmente, pela necessidade de ATP para eventos que ocorrem durante a maturação. Neste momento, a distribuição das mitocôndrias se torna difusa pelo citoplasma (TARAZONA et al., 2006).

O citoesqueleto promove o reposicionamento das organelas, o qual depende das necessidades da célula durante cada etapa do desenvolvimento. Assim, elas assumirão posições diferentes no estágio de VG e MII (FERREIRA et al., 2009). A

dinâmica das alterações no citoesqueleto, principalmente de microtúbulos e microfilamentos, promovem a regulação da formação do fuso meiótico, alinhamento e segregação dos cromossomos, movimentação do material nuclear do centro para a região cortical e emissão dos corpúsculos polares (LI et al., 2005).

Os microfilamentos consistem de unidades de actina globulares e compactas (MAO et al., 2014). Estes compõem a maior parte do citoesqueleto e são responsáveis por promover a divisão celular (KIM et al., 2000). Sendo assim, a maturação nuclear é dependente do citoesqueleto (ROTH; HANSEN, 2005).

Durante todo o processo de maturação oocitária, os microfilamentos se dispõem na região cortical do oócito (LI et al., 2005), onde eles ficam associados à membrana plasmática e promovem o remodelamento da estrutura celular através da regulação das proteínas ligadas à actina (SUN; SCHATTEN, 2006).

No estágio de VG, os microfilamentos também se localizam ao redor do núcleo (KIM et al., 2000) e, desta fase até a anáfase I, não se ligam aos cromossomos. No início da anáfase I, os cromossomos permanecem rodeados por microfilamentos e na transição para telófase I, a maior parte deles permanece junto à cromatina destinada a ser o corpúsculo polar. Quando da extrusão do corpúsculo polar, no oócito em MII, os microfilamentos se posicionam no corpúsculo polar (LI et al., 2005) e entre a cromatina, indicando sua importância no processo de maturação oocitária (KIM et al., 2000).

Entre os oócitos que não atingem MII, 50 a 60% possuem anormalidades na morfologia cortical dos microfilamentos, caracterizadas por degeneração em múltiplos pontos da camada cortical ou pelo enfraquecimento da mesma, sugerindo a incapacidade desses oócitos em polimerizar a actina F (SOMFAI et al., 2011). As alterações no citoesqueleto podem desencadear a apoptose (ROTH; HANSEN, 2005).

## **2.2. Inibidores da meiose**

O estágio de VG deve ser mantido até que o oócito complete seu crescimento (SÁNCHEZ; SMITZ, 2012) e, é durante o bloqueio meiótico que os oócitos adquirem alta competência para o desenvolvimento (HASHIMOTO et al., 2002), pois os baixos níveis de AMPc durante o bloqueio antes da maturação aumentam o tempo para que

a maturação citoplasmática se torne completa (GUIXUE et al., 2001). Portanto, na tentativa de aumentar a competência dos oócitos MIV podem ser utilizados inibidores da maturação nuclear que agem nas proteínas cinases ou nas PDE, responsáveis pelo controle do AMPc, ou ainda na ativação do MPF.

Ao modular os níveis de AMPc é possível equiparar a competência de oócitos MIV com os maturados *in vivo* (GILCHRIST, 2011), pois os altos níveis de AMPc são importantes na manutenção do bloqueio da meiose por ativação da PKA e inativação da CDK1. A diminuição destes níveis inativam a PKA, ativam a CDK1 e, conseqüentemente, ocorre a progressão da meiose (LI et al., 2012).

Tem sido sugerido o bloqueio ou inibição da maturação nuclear de forma que o oócito tenha mais tempo para acumular moléculas importantes para o desenvolvimento embrionário inicial, podendo melhorar a eficiência da PIV (BILODEAU-GOESEELS, 2012).

Inibidores de CDK são utilizados para prevenir a retomada precoce da meiose, permitindo a maturação citoplasmática adequada, aumentando a competência para a fertilização e posterior desenvolvimento embrionário (KNOCKAERT et al., 2002). Dentre estes, os principais inibidores descritos na literatura com utilização em oócitos bovinos são a butirolactona I (ADONA; LEAL, 2004; ADONA; LEAL, 2006) e a roscovitina (MERMILLOD et al., 2000; MARQUES et al., 2011). Ambos são inibidores da cdc2 (BILODEAU-GOESEELS, 2012), além da bohemina (ADONA e LEAL, 2006), os quais inibem seletivamente a atividade do MPF (KNOCKAERT et al., 2002), mas não interferem nos níveis proteicos e na localização da MAPK e da p34<sub>cdc2</sub> (QUETGLAS et al., 2010). A butirolactona I inibe a GVBD de forma reversível e também está associada à inibição do MPF e da MAPK (KUBELKA et al., 2000).

Inibidores de PDE são capazes de bloquear a meiose por inibir a ação desta enzima, responsável pela degradação do AMPc (ALBUZ et al., 2010; SASSEVILLE et al., 2009; THOMAS et al., 2002). Dentre eles, os mais utilizados em oócitos bovinos são o 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (LODDE et al., 2013), cilostamida (THOMAS et al., 2002; SASSEVILLE et al., 2009), milrinona (NARUSE et al., 2012) e rolipram (SASSEVILLE et al., 2009).

Cilostamida e milrinona são inibidores específicos das PDE tipo 3, a família das PDE expressa predominantemente nos oócitos (SASSEVILLE et al., 2009). A adição de cilostamida na maturação retarda a diminuição dos níveis de AMPc (ALBUZ et al., 2010). O uso de milrinona em oócitos proporciona níveis satisfatórios de competência para o desenvolvimento embrionário após transferência nuclear (NARUSE et al., 2012). Já o rolipram é um inibidor das PDE tipo 4, a família expressa predominantemente nas células do cumulus, o qual é efetivo em mimetizar a indução da maturação nuclear por gonadotrofinas (LÓPEZ et al., 2008).

Albuz e colaboradores (2010) propuseram um sistema de MIV, denominado SPOM ("*simulated physiological oocyte maturation*") que consiste em uma fase de pré-maturação na presença de IBMX e forskolina por 1 a 2 horas, com o objetivo de aumentar rapidamente as concentrações de AMPc no oócito, seguida por um período mais longo de MIV, na presença de cilostamida, visto que a exposição contínua dos oócitos a um inibidor da PDE 3 melhora o potencial destes oócitos para o desenvolvimento embrionário. O SPOM foi capaz de aumentar a taxa de fertilização e de blastocistos quando comparado a MIV tradicional.

O fluido folicular pode ser utilizado como alternativa biológica para a inibição da meiose por conter fatores que inibem a retomada da meiose (SIRARD et al., 1998). Foi observada inibição da maturação nuclear de oócitos MIV em meio suplementado com fluido folicular obtido de folículos logo após o pico de LH. No entanto, o fluido folicular obtido de folículos após 8h e 20h do pico de LH não foi capaz de inibir a meiose (ROMERO-ARREDONDO; SEIDEL JR, 1994). Além disso, a suplementação do meio de maturação com fluido folicular oriundo de folículos de tamanho médio e grande foi capaz de diminuir a taxa de apoptose e prevenir o estresse oxidativo (PARK et al., 2014).

### **2.3. Apoptose**

Apoptose é uma forma de morte celular programada responsável pela remoção de células mutantes ou danificadas (WARZYCH et al., 2007). Durante este processo ocorrem mudanças morfológicas que incluem a condensação do citoplasma e da cromatina, e fragmentação do DNA com a separação do núcleo em pequenas massas. Nas fases finais se formam corpos apoptóticos que são

fagocitados pelas células adjacentes ou eliminados no lúmen adjacente (MATWEE et al., 2000).

A regulação da apoptose envolve os genes da família Bcl-2, da qual o Bax é pró-apoptótico e o Bcl-2 é anti- apoptótico (YANG; RAJAMAHENDRAN, 2002). Agentes indutores da apoptose como o estresse oxidativo ou proteínas Bax estimulam a liberação do citocromo c que, quando em excesso, pode ativar as caspases e levar à apoptose (MATWEE et al., 2000).

A apoptose mediada pela mitocôndria resulta da ativação das caspases 3 e 6 pela caspase 9, que é uma caspase iniciadora, enquanto que as caspases 8 e 10 iniciadoras ativam as caspases executoras 3 e 7 no receptor das cascata apoptótica (VANDAELE et al., 2007). A síntese *de novo* de mRNA e a ativação de caspases é necessária para o processo de apoptose, porém a atividade das caspases em oócitos não pode ser utilizada como um marcador de apoptose devido à inconsistência da presença delas em oócitos bovinos e por estes possuírem mecanismos capazes de bloquear a tradução e ativação de caspases (YUAN et al., 2004). Por outro lado, a detecção da atividade das caspases 3 e 7 em embriões pode ser utilizada como marcador de apoptose (VANDAELE et al., 2007).

A ativação de caspases e a presença de fragmentação nuclear não podem ser correlacionadas, pois a ativação das caspases ocorre precocemente na cascata da apoptose e os corpos apoptóticos se formam somente no final (VANDAELE et al., 2007).

#### **2.4. Estresse oxidativo**

As espécies reativas do oxigênio (ROS) são formadas no metabolismo aeróbico durante a redução do oxigênio. O radical superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH\cdot$ ) correspondem à redução de um, dois ou três elétrons, respectivamente e são as ROS responsáveis pelo estresse oxidativo em gametas e embriões (GUÉRIN et al., 2001).

As ROS podem ser produzidas a partir dos gametas ou por fatores ambientais (AGARWAL et al., 2006), assim como por processos metabólicos e enzimas, principalmente, pela fosforilação oxidativa, NADPH oxidase e xantina oxidase.

Dentre os fatores ambientais, a concentração de oxigênio implica na formação de ROS que é aumentada durante o cultivo em ar atmosférico (GUÉRIN et al., 2001).

A maior parte das ROS produzidas em condições fisiológicas são provenientes da cadeia respiratória mitocondrial, o maior sistema consumidor de oxigênio da célula (PANDEY et al. 2010). A redução da atividade da cadeia respiratória leva a diminuição da produção de ATP, resultando em menor taxa de maturação oocitária (MORADO et al., 2009). O aumento da atividade mitocondrial durante o início do desenvolvimento embrionário pode ser prejudicial ao embrião pela excessiva produção de ROS que não será eliminada (TARAZONA et al., 2006).

Os antioxidantes são responsáveis por manter o equilíbrio redox (TAKAHASHI, 2012). Vários elementos possuem função antioxidante, sendo a glutatona (GSH) o principal antioxidante presente em oócitos em embriões. Quando há um desequilíbrio entre os agentes pró- e anti- oxidantes ocorre o estresse oxidativo que é responsável por diversos danos celulares, incluindo alterações na mitocôndria, bloqueio no desenvolvimento embrionário, gasto de ATP e apoptose (GUÉRIN et al., 2001).

A proteção contra o estresse oxidativo *in vivo* é feita por substâncias presentes no fluido folicular (GUÉRIN et al., 2001) que quando utilizado como suplemento na MIV é capaz de aumentar o conteúdo de GSH e conseqüentemente, diminuir as ROS (PARK et al., 2014).

## 5. REFERÊNCIAS

ADONA, P. R.; LEAL, C. L. V. Effect of concentration and exposure period to butyrolactone I on meiosis progression in bovine oocytes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 58, n.3, p. 354-359, 2006.

ADONA, P. R.; LEAL, C. L. V. Meiotic inhibition with different cyclin-dependent kinase inhibitors in bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. **Zygote**. v. 12, n. 3, p. 197-204, 2004.

AGARWAL, A.; SAID, T. M.; BEDAIWY, M. A.; BANERJEE, J.; ALVAREZ, J. G. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. **Fertility and Sterility**. v. 86, n. 3, p. 1-10, 2006.

ALBARRACÍN, J. L.; MORATÓ, R.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T. Vitrification of calf oocytes: Effects of maturation stage and prematuration treatment on the nuclear and cytoskeletal components of oocytes and their subsequent development. **Molecular Reproduction and Development**. v. 72, p. 239-249, 2005.

ALBUZ, F. K.; SASSEVILLE, M.; LANE, M.; ARMSTRONG, D. T.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Human Reproduction**. v. 25, n. 12, p. 2999-3011, 2010.

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

BILODEAU-GOESEELS, S. Cows are not mice: The role of cyclic AMP, phosphodiesterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**. v. 78, p. 734-743, 2011.

BILODEAU-GOESEELS, S. Bovine oocyte meiotic inhibition before *in vitro* maturation and its value to *in vitro* embryo production: Does it improve developmental competence? **Reproduction in Domestic Animals**. v. 47, p. 687-693, 2012.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; GUILBAULT, L. A.; SIRARD, M. A. *In vitro* production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology**. v. 47, n. p. 1061-1075, 1997.

CHEN, N.; LIOW, S.; YIP, W.; TAN, L.; NG, S. Influence of cysteamine supplementation and culture in portable dry-incubator on the *in vitro* maturation, fertilization and subsequent development of mouse oocytes. **Theriogenology**. v. 63, p. 2300-2310, 2005.

COLEMAN, N. SHAGIAKHMETOVA, G. A.; LEBEDEVA, I. Y.; KUZMINA, T.; GOLUBEV, K. *In vitro* maturation and early developmental capacity of bovine oocytes cultured in pure follicular fluid supplementation with follicular wall. **Theriogenology**. v. 67, p. 1053-1059, 2007.

CUMMINS, J. M. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. v. 115S, p. S23-S29, 2004.

DEKEL, N. Cellular, biochemical and molecular mechanism regulating oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 234, p. 19-25, 2005.

DENIS, R. Aspiración folicular *in vivo* (OPU) una nueva perspectiva en el campo de las biotecnologías de la reproducción. **Ciencia y Tecnología Ganadera**. v. 2, p. 57-70, 2008.

FERREIRA, E. M. VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; MEIRELLES, F. V.; FERRIANI, R. A.; NAVARRO, P. A. A. S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**. v. 71, p. 836-848, 2009.

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

GUÉRIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction**. v. 7, n. 2, p. 175-189, 2001.

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

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

HENDRIKSEN, P. J. M.; VOS, P. L. A. M.; STEENWEG, W. N. M.; BEVERS, N. M.; DIELEMAN, S. J. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. **Theriogenology**. v. 53, p.11-20, 2000.

HUA, S.; ZHANG, H.; SONG, Y.; LI, R.; LIU, J.; WANG, Y.; QUAN, F.; ZANG, Y. High expression of Mfn1 promotes early development of bovine SCNT embryos: Improvement of mitochondrial membrane potential and oxidative metabolism. **Mitochondrion**. v. 12, p. 320-327, 2012.

HURK, V. D. R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**. v. 63, p. 1717-1751, 2005.

JESETA, M.; KNITLOVA, D. C.; HANZALOVA, K.; HULINSKA, P.; HANULAKOVA, S.; MILAKOVIC, I.; NEMCOVA, L.; KANKA, J.; MACHATKOVA, M. Mitochondrial patterns in bovine oocytes with different meiotic competence related to their *in vitro* maturation. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 49, p. 469-475, 2014.

KIM, N.; CHO, S. K.; CHOI, S. H.; KIM, E. Y.; PARK, S. P.; LIM, J. H. The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes during *in vitro* maturation. **Zygote**. v. 8, p. 25-32, 2000.

KNOCKAERT, M.; GREENGARD, P.; MEIJER, L. Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. **Trends Pharmacological Science**. v. 23, n. 9, p. 417-425, 2002.

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

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

LI, J.; MAO, G.; XIA, G. FSH modulates PKAI and GPR3 activities in mouse oocyte of COC in a gap junctional communication (GJC) – dependent manner to initiate meiotic resumption. **PLoS ONE**. v. 7, n. 9, p. 37835, 2012.

LODDE, V.; FRANCIOSI, F.; TESSARO, I.; MODINA, S. C.; LUCIANO, A. M. Role of gap junction-mediated communications in regulating large-scale chromatin configuration remodeling and embryonic developmental competence acquisition in fully grown bovine oocyte. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**. v. 30, p. 1219-1226, 2013.

LÓPEZ, Y. S.; MEJÍA, A. M.; BIOL ESCOBAR, E. E.; AGUDELO JARAMILLO, B.; VÁSQUEZ ARAQUE, N. A.; ECHAVARRÍA, H. Efecto del inhibidor de fosfodiesterasa tipo 4 – rolipram, sobre la maduración *in vitro* de oocitos bovinos. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**. v. 21, p. 59-65, 2008.

MAO, L.; LOU, H.; LOU, Y.; WANG, N.; JIN, F. Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. **Reproductive BioMedicine Online**. v. 28, p. 284-299, 2014.

MARQUES, M. G.; MELLO, M. R. B.; TAVARES, L. M. T.; NICACIO, A. C.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D.; VISITIN, J. A. Maturação e desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos após bloqueio da meiose com inibidores de MPF. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 48, n. 6, p. 468-477, 2011.

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

MEHLMANN, L. M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction**. v. 130, p. 791-799, 2005.

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

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

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

NARUSE, K.; IGA, K.; SHIMIZU, M.; TAKENOUCI, N.; AKAGI, S.; SOMFAI, T.; HIRAO, Y. Milrinone treatment of bovine oocytes during *in vitro* maturation benefits production of nuclear transfer embryos by improving enucleation rate and developmental competence. **Journal of Reproduction and Development**. v. 58, n. 4, p. 476-483, 2012.

PANDEY, A. N.; TRIPATHI, A.; PREMKUMAR, K. V. Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 111, p. 521-528, 2010.

PARK, S. H.; CHO, H. S.; YU, I. J. Effect of bovine follicular fluid on reactive oxygen species and glutathione in oocytes, apoptosis and apoptosis-related gene expression of *in vitro*-produced blastocysts. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 49, p. 370-377, 2014.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**. v. 66, p. 1169-1177, 2002.

PEIXER, M. A. S.; DODE, M. A. N.; RUMPF, R. *In vitro* production of embryos – Embrapa genetic resources and biotechnology point of view. **Arquivo da Faculdade de Veterinária UFRGS**. v. 28, p. 163-166, 2000.

QUETGLAS, M. D.; ADONA, P. R.; de BEM, T. H. C.; PIRES, P. R.L. LEAL, C. L. V. Effect of cyclin-dependent kinase (CDK) inhibition on expression, localization and activity of maturation promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) in bovine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 45, p. 1074-1081, 2010.

ROMERO-ARREDONDO, A.; SEIDEL JR, G.E. Effects of bovine follicular fluid on maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**. v. 41, p. 383-394, 1994.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. **Reproduction**. v. 129, p. 235-244, 2005.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1822, p. 1896-1912, 2012.

SASSEVILLE, M.; ALBUZ, F. K.; CÔTÉ, N.; GUILLEMETTE, C.; GILCHRIST, R. B.; RICHARD, F. J. Characterization of novel phosphodiesterases in the bovine ovarian follicle. **Biology of Reproduction**. v. 81, p. 415-425, 2009.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**. v. 49, p. 483-497, 1998.

SOMFAI, T.; KIKUCHI, K.; KANEDA, M.; AKAGI, S.; WATANABE, S.; MIZUTANI, E.; HARAGUCHI, S.; DANG-NGUYEN, T. Q.; INABA, Y.; GESHI, M.; NAGAI, T. Cytoskeletal abnormalities in relation with meiotic competence and ageing in porcine and bovine oocytes during *in vitro* maturation. **Journal of Veterinary Medicine**. v. 40, p. 335-344, 2011.

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

SUN, Q.; SCHATTEN, H. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. **Reproduction**. v. 131, p. 193-205, 2006.

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

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

THOMAS, R. E.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B. Differential effects of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on bovine oocyte meiotic maturation. **Developmental Biology**. v. 244, p. 215-225, 2002.

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

WARZYCH, E.; WRENZYCKI, C.; PEIPPO, J.; LECHNIAK, D. Maturation medium supplements affect transcript level of apoptosis and cell survival related genes in bovine blastocysts produced *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**. v. 74, p. 280-289, 2007.

WEHREND, A.; MEINECKE, B. Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during *in vitro* maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. **Animal Reproduction Science**. v. 66, p. 175-184, 2001.

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 Reproduction Science**. v. 70, p. 159-169, 2002.

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

YUAN, Y. Q.; PEELMAN, L. J.; WILLIAMS, J. L.; VAN ZEVEEREN, A.; KRUIF, A.; LAW, A.; VAN SOOM, A. Mapping and transcription profiling of CASP1, 3, 6, 7 and 8 in relation to caspase activity in the bovine cumulus-oocyte complex. **Animal Genetics**. v. 35, p. 234-237, 2004.

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

**RESUMO** - O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da inibição da meiose com inibidores farmacológicos ou biológicos durante o transporte de oócitos bovinos por 6 horas sobre a maturação nuclear, citoplasmática e qualidade dos oócitos. Para tanto, o meio de transporte de oócitos foi suplementado com butirólactona-I (BL), milrinona (MR), IBMX e forskolina (CL) ou fluido folicular puro (FF) e o meio de maturação somente do grupo transportado com IBMX e forskolina foi suplementado com cilostamida. Os oócitos foram incubados em incubadora portátil (Minitub®) para simulação de transporte, durante 6h. Posteriormente, foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV) até completar 24h. Foram feitos dois grupos controle: MIV em 5% de CO<sub>2</sub> em ar por 24h (C1) e; MIV por 6h na transportadora e mais 18h em 5% de CO<sub>2</sub> em ar (C2). Foi avaliada a cinética da maturação nuclear após o transporte e durante a MIV, quando também foi avaliada a expansão das células do cumulus. As avaliações da maturação citoplasmática após o transporte e ao final da MIV foram feitas pelos seguintes parâmetros: avaliação do posicionamento de mitocôndrias, do potencial de membrana mitocondrial, do posicionamento dos microfilamentos de actina, da taxa de apoptose e da concentração do conteúdo intracelular de espécies reativas do oxigênio. A taxa de oócitos em metáfase II após 24h de MIV não foi afetada ( $P>0,05$ ) pelos tratamentos (61,2%-74,7%). A expansão das células do cumulus foi maior ( $P<0,05$ ) no grupo FF após as 6h e não diferiu entre os grupos ao final da MIV (4,8-5,0). A distribuição dos microfilamentos de actina na categoria difusa (37,4%) foi maior ( $P<0,05$ ) após 6h de MIV no grupo MR quando comparado aos oócitos imaturos (6,4%) e ao grupo FF (8,1%), porém foi predominante na categoria normal e não diferiu ( $P>0,05$ ) entre os grupos ao final da MIV (65,5%-84,2%). A distribuição citoplasmática de mitocôndrias foi predominantemente periférica (47,8%-73,3%) em oócitos imaturos e dispersa (77,7%-89,0%) após a MIV. O potencial de membrana mitocondrial foi semelhante ( $P>0,05$ ) entre os grupos (148,3-168,1) após 6h e após 24h de MIV os oócitos dos

grupos C1 (231,9) e C2 (219,8) apresentaram maior ( $P < 0,05$ ) potencial de membrana mitocondrial quando comparados aos grupos MR (155,2) e FF (161,9), porém não diferiram de BL (189,5). A quantidade intracelular de ROS após 6h foi menor ( $P < 0,05$ ) no grupo BL (141,9) comparado com MR (160,8) e ambos foram semelhantes ( $P > 0,05$ ) aos demais tratamentos (145,8-153,7). A taxa de apoptose em oócitos imaturos (1,5%) e após o transporte (6h) no grupo C1 (1,3%) foi menor ( $P < 0,05$ ) quando comparados com MR (13,8%) e C2 (12,0%) e não diferiram ( $P > 0,05$ ) de BL (7,5%), CL (7,8%) e FF (7,1%). Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) na taxa de apoptose nos oócitos maduros (2,3%-8,8%). A adição de inibidores da meiose (butirolactona-I, IBMX associado à forskolina e fluido folicular), com exceção da milrinona, ao meio de transporte de oócitos bovinos permite um transporte adequado por 6h, preservando a qualidade e integridade dos oócitos e proporcionando condições de maturação oocitária semelhante à obtida *in vitro* a partir de oócitos que não foram submetidos ao transporte.

**Palavras-chave:** maturação *in vitro*, inibição da meiose, transporte de oócitos

## 1. INTRODUÇÃO

A remoção do oócito do ambiente folicular promove a retomada espontânea da meiose na ausência de fatores necessários para a maturação citoplasmática (Thomas et al., 2004). O uso de substâncias que promovem retardo na meiose pode ser uma estratégia para promover a maturação citoplasmática enquanto a maturação nuclear está bloqueada e, desta forma, melhorar a competência oocitária. Esta competência é adquirida em resposta às adequadas alterações nucleares, citoplasmáticas e moleculares que ocorrem no oócito durante o processo de maturação *in vitro* (MIV), as quais proporcionam ao oócito condições para que este possa ser adequadamente fertilizado e consiga sustentar o desenvolvimento embrionário inicial até o momento da ativação do genoma embrionário, que no bovino ocorre no estágio de 8-16 células (De Matos e Furnus, 2000).

A redistribuição das organelas citoplasmáticas e a dinâmica dos filamentos do citoesqueleto são eventos que ocorrem durante o processo denominado de maturação citoplasmática (Ferreira et al., 2009). Os filamentos do citoesqueleto podem permanecer inalterados ou se modificar de acordo com as necessidades da célula, já que participam ativamente no reposicionamento das organelas citoplasmáticas e na capacitação oocitária durante a maturação nuclear (Ferreira et al., 2009). Alterações no citoesqueleto podem implicar em diminuição de oócitos que concluem a maturação nuclear, ou seja, que atingem o estágio de metáfase II da redução meiótica (Somfai et al., 2011).

Os eventos que ocorrem durante a maturação citoplasmática consomem energia e, por isso, o movimento das mitocôndrias para áreas de alto consumo de energia é imprescindível (Mao et al., 2014). A atividade metabólica da mitocôndria é representada pelo potencial de membrana mitocondrial (Hua et al., 2012) e o aumento deste durante a MIV está relacionado com a competência oocitária (Jeseta et al., 2014). Porém, o aumento exacerbado pode levar ao estresse oxidativo, pelo aumento da produção de espécies reativas do oxigênio (ROS), prejudicando o desenvolvimento embrionário subsequente (Tarazona et al., 2006).

As ROS são formadas no metabolismo aeróbico durante a redução do oxigênio. Elas são produzidas por gametas, fatores ambientais e processos metabólicos, principalmente pela fosforilação oxidativa (AGARWAL et al., 2006; GUÉRIN et al., 2001). Sendo a maior parte delas provenientes da cadeia respiratória mitocondrial (PANDEY et al., 2010).

O aumento das concentrações intracelulares de ROS provoca o estresse oxidativo que é responsável por diversos danos celulares, incluindo alterações mitocondriais, gasto de ATP, bloqueio no desenvolvimento embrionário e apoptose (GUÉRIN et al., 2001).

A aquisição da competência oocitária é menor quando oócitos são maturados *in vitro* em comparação com aqueles obtidos *in vivo*, dado que apenas 35-40% de oócitos maturados, fecundados e cultivados *in vitro* se desenvolvem até o estágio de blastocisto (Sirard, 2006). Isto porque, apesar de inúmeros esforços para se melhorar as condições de cultivo, nenhum sistema ainda conseguiu mimetizar com exatidão as condições do ambiente uterino. Assim, os sistemas de cultivo tem um forte impacto na produção *in vitro* de embriões (PIV) e condições não satisfatórias podem prejudicar os resultados.

Oócitos obtidos em fazendas, a partir de aspiração folicular guiada por ultrassonografia em vacas doadoras, geralmente são transportados até o laboratório em incubadoras portáteis com controle de temperatura, mas sem controle de atmosfera gasosa. Tal condição pode prejudicar ainda mais a competência e viabilidade oocitária (Guemra et al., 2014). Nesta situação, a utilização de bloqueadores da maturação nuclear pode ser uma opção de melhorar o sistema de transporte.

A maturação nuclear pode ser retardada com o auxílio de drogas que afetam a quantidade de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) no oócito (Sirard, 1990). Inibidores de fosfodiesterases retardam a progressão da meiose e aumentam a capacidade do oócito suportar o desenvolvimento embrionário (Thomas et al., 2004), uma vez que esta enzima é responsável pela degradação do AMPc. Os inibidores de fosfodiesterases do tipo 3, como milrinona e cilostamida, são capazes de bloquear a meiose, o que não ocorre com a inibição da fosfodiesterase tipo 4, como o rolipram (Mayes e Sirard, 2002). A associação de inibidores de fosfodiesterases com

estimuladores da adenilato ciclase (enzima que aumenta os níveis de AMPc), como a forskolina, causa retardo na progressão meiótica e melhora a competência oocitária (Thomas et al., 2004), o que é proposto pelo sistema SPOM (Albuz et al., 2010).

A butirolactona-I, um inibidor de cinases dependentes de ciclinas (CDK), é capaz de bloquear a meiose em oócitos bovinos de forma reversível por inibir a ativação do fator promotor da maturação, melhorando a competência dos oócitos (Kubelka et al., 2000).

Inibidores biológicos da meiose também já se mostraram ser eficazes. O cultivo de oócitos em fluido folicular oriundo de folículos que não sofreram ação do LH é capaz de retardar a meiose (Romero-Arredondo e Seidel Jr, 1994).

O estabelecimento de um sistema favorável à manutenção da qualidade do oócito bovino é essencial para se melhorar a produção de embriões *in vitro* de oócitos transportados do campo ao laboratório. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do transporte de oócitos bovinos com inibidores farmacológicos ou biológicos da meiose sobre a maturação nuclear e citoplasmática dos oócitos.

## **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. Materiais plásticos e tubos foram obtidos da empresa Corning Inc. (Acton, MA, USA).

### **Obtenção e seleção de oócitos**

Complexos cumulus-oócitos foram obtidos através de aspiração de folículos ovarianos de 3-8 mm de diâmetro, provenientes de abatedouro, não excedendo o limite de 4 horas desde o abate até o início das aspirações. Durante a seleção, os oócitos foram mantidos em fluido folicular centrifugado acrescido de antibiótico para

prevenir a retomada imediata da meiose. O fluido folicular foi obtido em cada rotina através da centrifugação do sobrenadante por 5 minutos à 12500xg, em seguida, o sobrenadante foi recuperado e acrescido de 75 µg/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). Os oócitos com cumulus compacto contendo pelo menos quatro camadas de células e de aparência saudável (citoplasma de granulação homogênea) foram selecionados para os experimentos. O período de tempo da seleção até o início do cultivo foi de aproximadamente 1 hora.

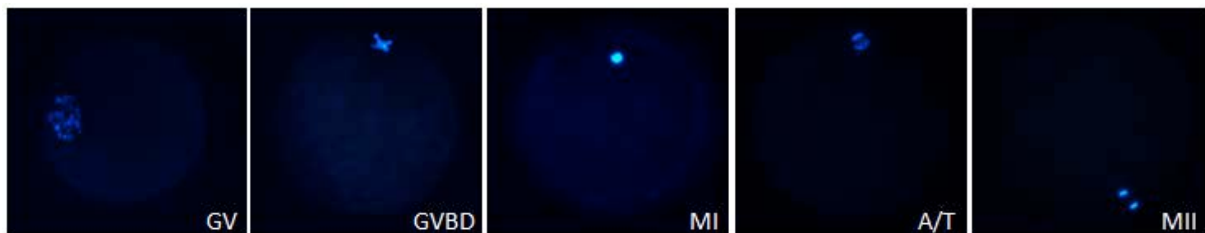
### **Simulação de transporte e cultivo de maturação *in vitro* de oócitos**

Os oócitos selecionados foram submetidos à simulação de transporte anteriormente ao cultivo de maturação *in vitro*. Para tanto, foram acondicionados em criotubos contendo 100 µL de meio de transporte (25-30 oócitos/criotubo), composto por TCM-199 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado com 0,2 mM de piruvato, 25 mM de bicarbonato de sódio, 75 µg/mL de amicacina, 0,5 µg/mL de FSH (Folligon®, MSD Animal Health, São Paulo, Brasil), 100 UI/mL de hCG (Vetecor®, Hertape Calier, Juatuba, Brasil) e 0,3% de BSA, além de inibidor da meiose (descrição dos grupos no item Delineamento Experimental). O meio foi coberto com óleo mineral e os criotubos foram gaseificados com mistura gasosa contendo 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub> em balanço. A seguir, foram acondicionados em incubadora portátil (Minitub®) a 38,5°C durante 6 horas.

Após a simulação de transporte em incubadora portátil, os oócitos dos grupos experimentais foram lavados para completa remoção dos inibidores e foram transferidos para microgotas de 100 µL (25-30 oócitos/gota) de meio de maturação, composto por TCM-199, suplementado com 0,2 mM de piruvato, 25 mM de bicarbonato de sódio, 75 µg/mL de amicacina, 0,5 µg/mL de FSH, 100 UI/mL de hCG e 0,6% de BSA, cobertas com óleo mineral, em incubadora com temperatura de 38,5°C, máxima umidade e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar, por mais 18 horas. Desta forma, o tempo máximo total de cultivo de maturação foi de 24 horas (6 horas em transporte simulado em incubadora portátil e mais 18 horas em incubadora de CO<sub>2</sub>).

### Avaliação da maturação nuclear

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



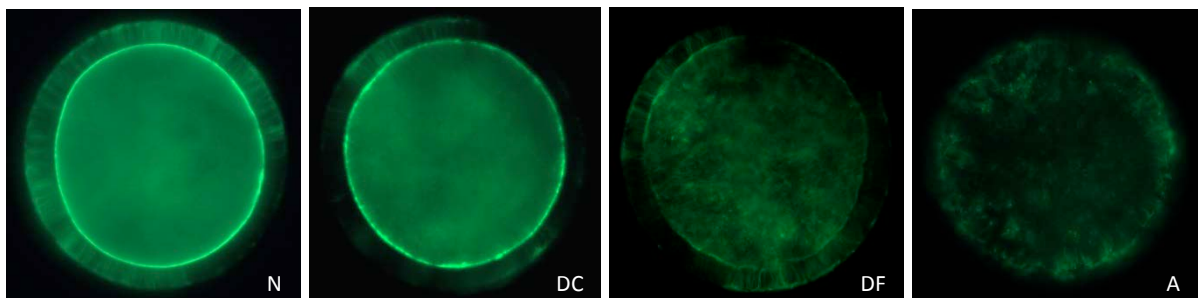
**Figura 1.** Imagem ilustrativa de oócito bovino corado com a sonda fluorescente Hoechst 33342 para identificação dos núcleos (em azul). Os oócitos foram avaliados em microscopia de epifluorescência (excitação 404 nm e emissão 526 nm; aumento 20 vezes). Classificação de acordo com a configuração nuclear em: vesícula germinativa (GV), quebra da vesícula germinativa (GVBD), metáfase da meiose I (MI), anáfase ou telófase da meiose I (A/T) e metáfase da meiose II (MII).

### Determinação do grau de expansão das células do cumulus

Os oócitos foram avaliados quanto ao grau de expansão das células do cumulus após o transporte (6h) e após 18h, 20h, 22h e 24h do cultivo de MIV, através de uma análise subjetiva, adaptada de Vanderhyden et al. (1990). Esta análise consiste de uma classificação em escores de 0 a 5, no qual 0 indica que não houve expansão, 1 indica mínima expansão e 5 indica o máximo de expansão observada.

### **Avaliação da distribuição dos microfilamentos de actina**

Para avaliação dos microfilamentos os oócitos foram desnudados e fixados em 4% de paraformaldeído por 10 minutos, permeabilizados em Triton X-100 0,5% em citrato de sódio 0,1% por 5 minutos e corados com 1 µg/mL de faloidina conjugada com FITC (Molecular Probes) e 1 µg/mL de Hoechst 33342 por 15 minutos, no escuro, em atmosfera ambiente. Posteriormente foram montados entre lâmina e lamínula e avaliados em microscópio invertido equipado com epifluorescência (Olympus IX51; excitação 495 nm e emissão 517 nm). A determinação da distribuição citoplasmática dos microfilamentos de actina foi realizada como descrito por Albarracín et al. (2005), de acordo com as seguintes categorias (Figura 2): normal (N), descontínua (DC), difusa (DF) e ausente (A). A coloração foi realizada em oócitos imediatamente após a remoção do folículo (0 horas), após o transporte (6 horas) e durante a MIV (18, 20, 22 e 24 horas).

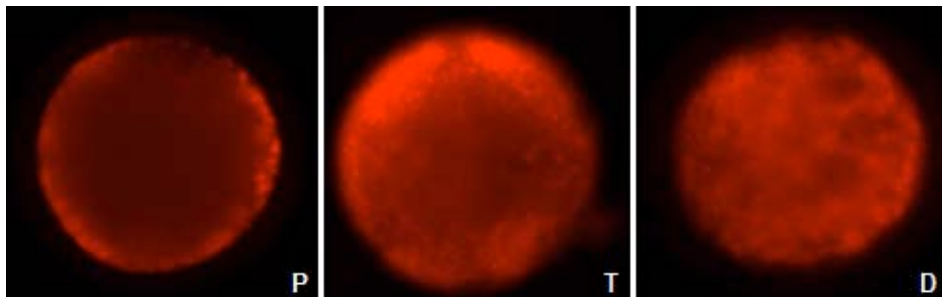


**Figura 2.** Imagem ilustrativa de oócitos bovinos corados com a sonda fluorescente faloidina conjugada com FITC e avaliados em microscopia de epifluorescência (excitação 495 nm e emissão 517 nm; aumento 20 vezes). Classificação de acordo com a predominância da distribuição citoplasmática dos microfilamentos de actina em normal (N), descontínua (DC), difusa (DF) e ausente (A).

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

A distribuição citoplasmática das mitocôndrias e o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) foram avaliados pela coloração com MitoTracker Red<sup>®</sup> (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 µM de MitoTracker Red<sup>®</sup> durante 30 minutos, no escuro, a 38,5°C e 5% de CO<sub>2</sub> 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) e classificados pela distribuição citoplasmática de mitocôndrias (Figura 3; distribuição periférica: oócitos imaturos; distribuição dispersa: oócitos maduros; transição: oócitos parcialmente maduros). 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. 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), após o transporte (6 horas) e após a MIV (24 horas).

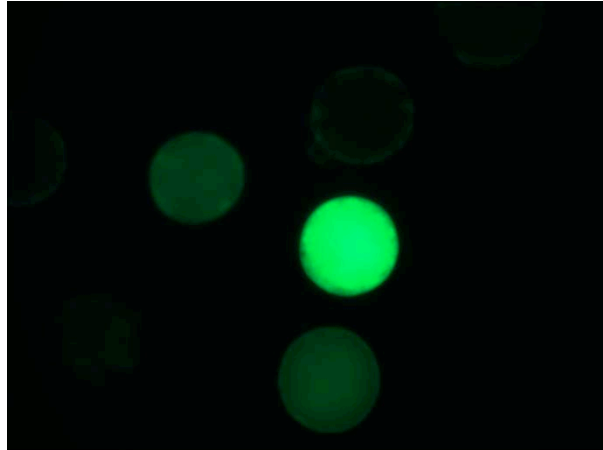


**Figura 3.** Imagem ilustrativa de oócitos bovinos corados com a sonda fluorescente MitoTracker Red® e avaliados em microscopia de epifluorescência (excitação 579 nm e emissão 599 nm; aumento de 20 vezes). Classificação de acordo com a predominância da distribuição citoplasmática das mitocôndrias em periférica (P), transição (T) e dispersa (D).

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

Os níveis intracelulares de ROS ( $H_2O_2$ ,  $HO\bullet$ ,  $ROO\bullet$ ) foram quantificados 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 oócitos após a remoção das células do cumulus. Os oócitos foram lavados duas vezes em PBS e incubados em 5  $\mu M$  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

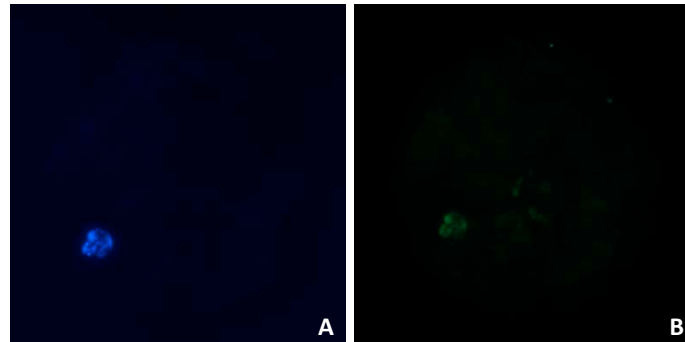
intensidade de fluorescência emitida (Figura 4), mensurada em pixels. Quanto maior a intensidade de fluorescência, maior o conteúdo intracelular de ROS. A coloração foi realizada em oócitos imediatamente após a remoção do folículo (0 horas), após o transporte (6 horas) e após a MIV (24 horas).



**Figura 4.** Imagem ilustrativa de oócitos bovinos corados com a sonda fluorescente H<sub>2</sub>DCFDA e avaliados em microscopia de epifluorescência (excitação 495 nm e emissão 520 nm; aumento de 20 vezes). Quanto maior a intensidade da fluorescência, maior o conteúdo intracelular de espécies reativas do oxigênio.

#### **Determinação da taxa de apoptose**

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. O procedimento foi realizado nos oócitos após a remoção das células do cumulus e com a zona pelúcida intacta. Os oócitos foram fixados em solução de paraformaldeído 4%, a temperatura ambiente por 1 hora, em seguida, foram permeabilizados em solução de Tritox X-100 0,5% em citrato de sódio 0,1% por 30 minutos em temperatura ambiente. Os oócitos foram avaliados quanto à fragmentação de DNA (células TUNEL positivas: fluorescência verde ou amarela pontual dentro do núcleo) em microscópio invertido equipado com epifluorescência (Olympus IX51; excitação 510-550 nm e emissão 590 nm; Figura 5). A coloração foi realizada em oócitos imediatamente após a remoção do folículo (0 horas), após o transporte (6 horas) e após a MIV (24 horas).



**Figura 5.** Imagem ilustrativa de oócito bovino corado com a sonda fluorescente Hoechst 33342 para identificação do material nuclear (em azul, A) e TUNEL para determinação da fragmentação nuclear (em verde, B) e avaliados em microscopia de epifluorescência (excitação 510-550 nm e emissão 590 nm; aumento de 20 vezes).

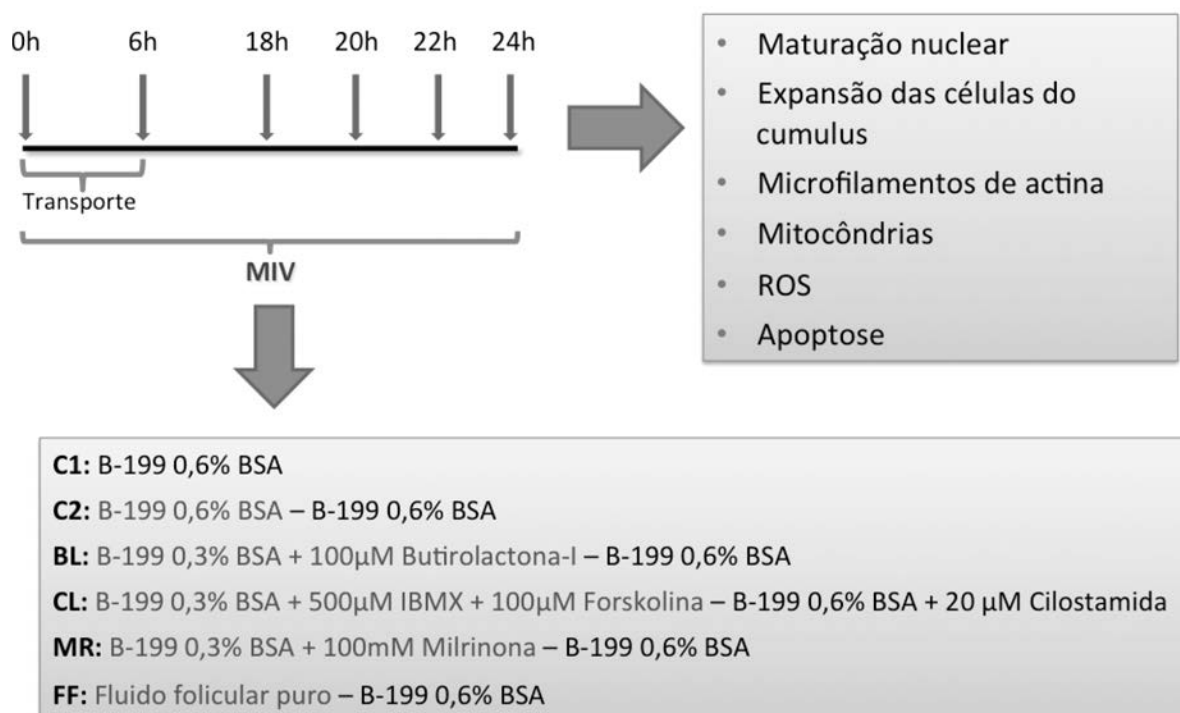
### **Delineamento experimental**

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do transporte simulado de oócitos bovinos em meio contendo inibidor da meiose sobre a maturação nuclear e citoplasmática dos mesmos, bem como o melhor momento para realização da fecundação. Para a simulação de transporte em incubadora portátil (Minitub®) com temperatura de 38,5°C em ar atmosférico, os oócitos foram cultivados por 6 horas em meio de transporte na presença de inibidores da meiose, de acordo com os seguintes tratamentos: 1) 100 µM de butirolactona-I (BL); 2) 500 µM IBMX + 100 µM de forskolina (CL); 3) 100 mM de milrinona (MR); e 4) fluido folicular puro, acrescido de 75 µg/mL de penicilina/estreptomicina (FF). Posteriormente, os oócitos dos grupos BL, MR e FF foram lavados para completa remoção dos inibidores e foram maturados em meio de maturação em incubadora com temperatura de 38,5°C, máxima umidade e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar por 12, 14, 16 ou 18 horas [desta forma, a duração total do cultivo (6 horas de transporte + MIV) foi respectivamente de 18, 20, 22 ou 24 horas]. Oócitos do grupo CL foram lavados para completa remoção dos inibidores e foram maturados em meio de maturação acrescido de 20 µM de cilostamida, sob as mesmas condições dos demais tratamentos.

Foram feitos 2 grupos controle: 1) C1: oócitos maturados em meio suplementado com BSA, em incubadora com temperatura de 38,5°C, máxima umidade e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar por até 24 horas; e 2) C2: oócitos maturados em meio suplementado com BSA, em incubadora portátil (Minitub®) durante 6 horas (simulação de transporte), sendo então transferidos para incubadora

com temperatura de 38,5°C, máxima umidade e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar por mais até 18 horas (total de 24 horas).

Os oócitos imaturos foram avaliados quanto à maturação nuclear logo após a aspiração dos folículos (0h). Os grupos controle (C1 e C2) e tratados (BL, CL, MR e FF) foram avaliados após 6, 18, 20, 22 e 24 horas de cultivo (transporte + MIV) pela coloração com Hoechst 33342 para determinação do momento final de conclusão da maturação (MII). A maturação citoplasmática foi avaliada pelo posicionamento das mitocôndrias, potencial de membrana mitocondrial (coloração com MitoTracker Red<sup>®</sup>), padrão de distribuição dos microfilamentos de actina (coloração com faloidina), taxa de apoptose (coloração com TUNEL), conteúdo intracelular de ROS (coloração com H<sub>2</sub>DCFDA) e expansão das células do cumulus (avaliação subjetiva). O esquema completo do delineamento experimental está representado na Figura 6.



**Figura 6.** Esquema representativo do delineamento experimental completo.

### Análise estatística

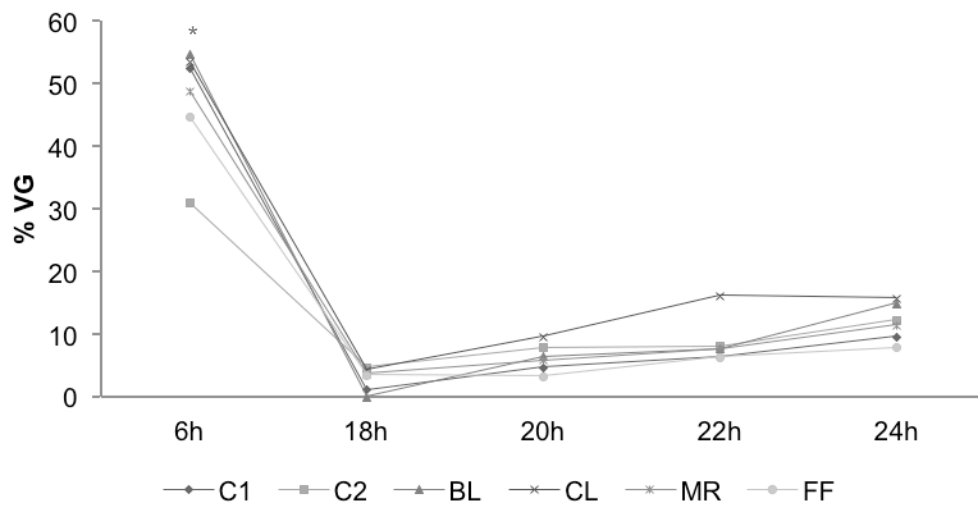
Para avaliação do efeito da simulação de transporte com inibidores da meiose sobre a maturação nuclear e citoplasmática, os dados foram analisados pela fração de oócitos cultivados que atingiram os determinados estádios de desenvolvimento

reportados em termos de porcentagem (%). Como as porcentagens não obtiveram distribuição normal, os dados foram transformados utilizando arco seno raiz quadrada. 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). Diferenças com probabilidades (P) menores que 0,05 foram consideradas significativas. Cada experimento foi repetido no mínimo 3 vezes para cada avaliação proposta, em replicatas independentes. Em cada replicata foi utilizada uma microgota com 25 oócitos, sendo a microgota considerada a unidade experimental.

### **3. RESULTADOS**

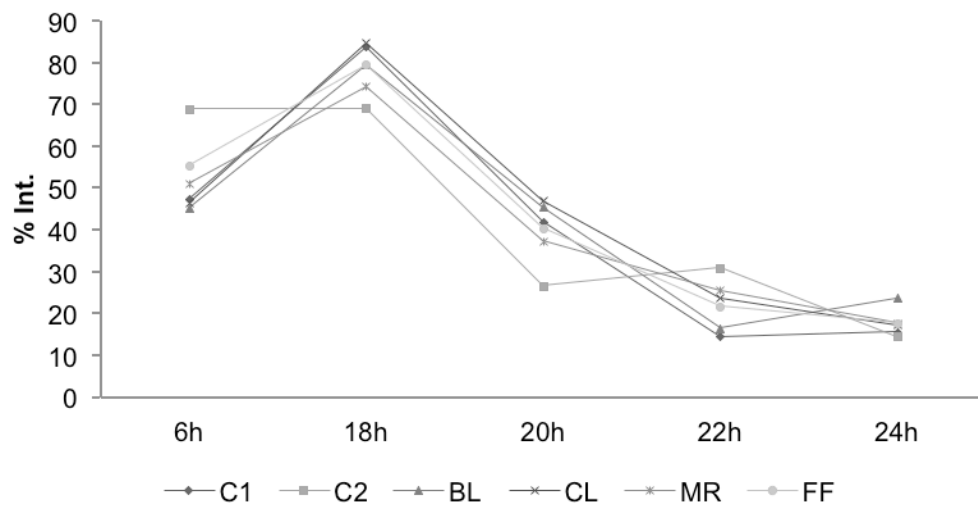
A maioria dos oócitos avaliados imediatamente após a remoção do folículo ovariano (0h) se encontrava na fase de VG (84,9%) da meiose, e menor proporção se encontrava na fase de GVBD (15,1%).

A taxa de oócitos em VG durante a MIV está representada na Figura 7. Após as 6h de transporte, não houve diferença entre os grupos ( $P > 0,05$ ) na taxa de oócitos em VG (31,0%-54,7%). Com 18h não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os grupos na taxa de oócitos em VG (0-4,7%). Após 20h, 22h e 24h de cultivo (transporte + MIV), não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os grupos nas taxas de VG (3,3%-9,5%, 6,3%-16,0%, e 7,8%-15,7%, respectivamente).



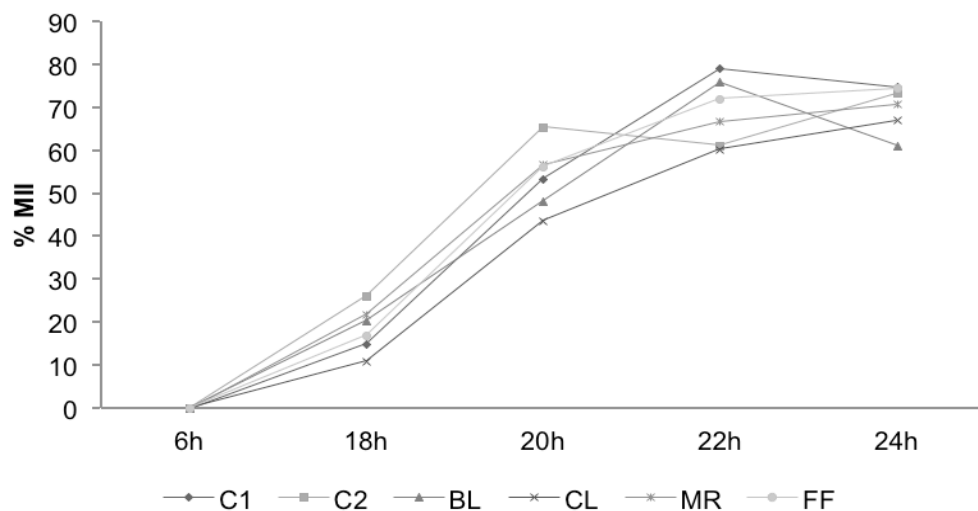
**Figura 7.** Taxa de oócitos em vesícula germinativa (VG) durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos cultivados com inibidores da meiose durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por até mais 18 horas, em meio livre de inibidor. C1 (controle 1): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; C2 (controle 2): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 6h em Minitub e por até 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; BL: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA e 100 μM Butirolactona-I por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; CL: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA, 100 μM Forskolina e 500 μM IBMX por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e 20 μM Cilostamida por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; MR: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA e 100 mM Milrinona por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; FF: oócitos pré-maturados em fluido folicular puro acrescido de antibiótico (75 μg/mL de penicilina/estreptomicina) por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA em incubadora 5% CO<sub>2</sub>. \*Indica diferença estatística entre os grupos pelo teste de Tukey (P<0,05).

Menores proporções (P<0,05) de oócitos se encontravam em estádios intermediários da meiose (Figura 8) após 6h nos grupos C1 (47,5%), BL (45,3%) e CL (46,6%) quando comparado ao grupo C2 (68,9%); porém, todos estes grupos não diferiram (P>0,05) dos grupos MR (51,2%) e FF (55,3%). Não foram observadas diferenças (P>0,05) às 18h em oócitos nas fases intermediárias da meiose (69,1%-84,8%). Após 20h, 22h e 24h de cultivo (transporte + MIV) não houve diferença (P>0,05) nas taxas de oócitos em estádios intermediários da meiose (26,6%-47,0%, 14,5%-30,8%, e 14,5%-23,8%, respectivamente).



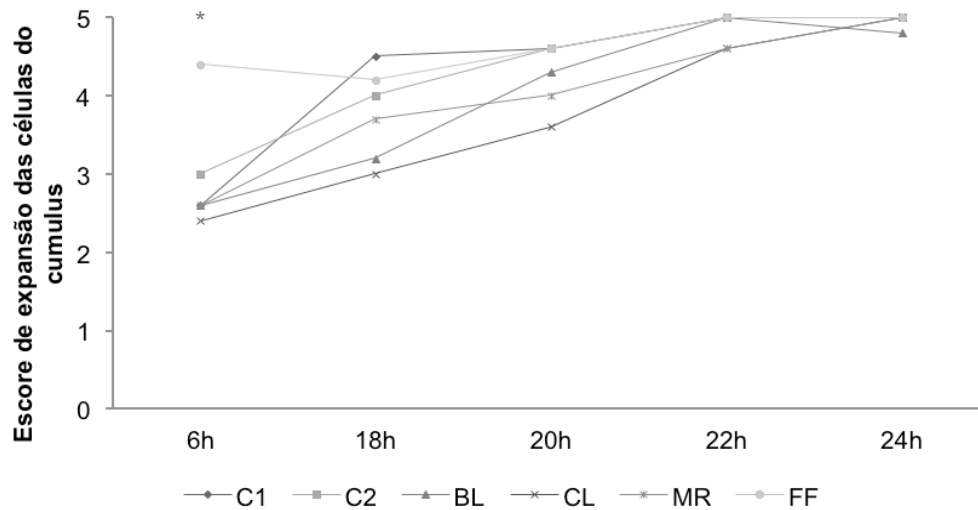
**Figura 8.** Taxa de oócitos em estádios intermediários da meiose (GVBD, MI, A/T) durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos cultivados com inibidores da meiose durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por até mais 18 horas, em meio livre de inibidor. C1 (controle 1): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; C2 (controle 2): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 6h em Minitub e por até 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; BL: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA e 100 µM Butirolactona-I por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; CL: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA, 100 µM Forskolina e 500 µM IBMX por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e 20 µM Cilostamida por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; MR: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA e 100 mM Milrinona por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; FF: oócitos pré-maturados em fluido folicular puro acrescido de antibiótico (75 µg/mL de penicilina/estreptomicina) por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA em incubadora 5% CO<sub>2</sub>. Dentro de cada momento de avaliação, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Tukey (P<0,05).

A taxa de oócitos em MII durante a MIV está representada na Figura 9. Não houve diferença (P>0,05) na taxa de MII às 18h (10,9%-26,1%). Após 20h, 22h e 24h de cultivo (transporte + MIV), a maioria dos oócitos de todos os grupos estava em MII, não apresentando diferença (P>0,05) entre eles nas taxas de MII (43,5%-65,5%, 60,3%-79,2%, e 61,2%-74,7%, respectivamente).



**Figura 9.** Taxa de oócitos em metáfase II (MII) durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos cultivados com inibidores da meiose durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por até mais 18 horas, em meio livre de inibidor. C1 (controle 1): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; C2 (controle 2): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 6h em Minitub e por até 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; BL: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA e 100 µM Butirolactona-I por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; CL: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA, 100 µM Forskolina e 500 µM IBMX por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e 20 µM Cilostamida por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; MR: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA e 100 mM Milrinona por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; FF: oócitos pré-maturados em fluido folicular puro acrescido de antibiótico (75 µg/mL de penicilina/estreptomicina) por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA em incubadora 5% CO<sub>2</sub>. Dentro de cada momento de avaliação, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Tukey (P<0,05).

A expansão das células do cumulus, avaliada em oócitos após a simulação de transporte (6h) e durante a MIV, está apresentada na Figura 10. Às 6h, o grupo FF (4,4%) apresentou maior (P<0,05) expansão das células do cumulus quando comparado aos demais (2,6%-3,0%). Durante a MIV não houve diferença (P>0,05) na expansão das células do cumulus entre os grupos avaliados às 18h (3,0%-4,5%), 20h (3,6%-4,6%), 22h (4,6%-5,0%) e 24h (4,8%-5,0%).



**Figura 10.** Escore de expansão das células do cumulus de oócitos bovinos cultivados com inibidores da meiose durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por até mais 18 horas, em meio livre de inibidor. Avaliação subjetiva em escala de 0 a 5 da expansão das células do cumulus, sendo que 0 (zero) corresponde a nenhuma expansão e 5 (cinco) corresponde à máxima expansão visualizada. C1 (controle 1): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; C2 (controle 2): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 6h em Minitub e por até 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; BL: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA e 100 µM Butirolactona-I por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; CL: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA, 100 µM Forskolina e 500 µM IBMX por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e 20 µM Cilostamida por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; MR: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA e 100 mM Milrinona por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; FF: oócitos pré-maturados em fluido folicular puro acrescido de antibiótico (75 µg/mL de penicilina/estreptomicina) por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA em incubadora 5% CO<sub>2</sub>. \*Indica diferença estatística entre os grupos pelo teste de Tukey (P<0,05).

A distribuição dos microfilamentos de actina em oócitos durante a MIV está resumida na Tabela 1. Em oócitos imaturos (0h), a distribuição dos microfilamentos de actina estava predominante nas categorias normal e descontínua (46,1% e 45,0%, respectivamente), assim como foi observado em todos os grupos após as 6h de transporte (17,1%-32,2% e 45,4%-57,9%, respectivamente), sem diferenças entre os grupos (P>0,05). Neste momento (6h de transporte), observaram-se maiores taxas (P<0,05) de categoria Difusa no grupo MR (37,4%) quando comparado aos oócitos imaturos (6,4%) e ao grupo FF (8,1%); porém, todos estes grupos foram semelhantes (P>0,05) aos demais (8,9%-27,2%). Às 18h de MIV

foi observado o mesmo padrão de classificação em normal e descontínua (45,7%-79,0% e 36,5%-44,8%, respectivamente) na maioria dos oócitos em todos os grupos avaliados, sem diferenças entre eles ( $P>0,05$ ). Às 20h e 22h, houve diminuição nas taxas de oócitos com distribuição descontínua (3,9%-26,0% e 1,9%-18,5%, respectivamente), enquanto que a categoria normal aumentou (66,4%-85,5% e 65,8%-88,1%, respectivamente), sem diferenças entre os grupos ( $P>0,05$ ). Ao final das 24h de MIV, a categoria normal (65,5%-84,2%) foi predominante em todos os grupos, sem haver diferenças entre eles ( $P>0,05$ ). A categoria ausente não apresentou diferença ( $P>0,05$ ) entre os grupos em nenhum dos tempos avaliados (1,8%-8,5%; 0-4,1%; 1,1%-12,7%; 0-15,6%; 3,2%-14,4%; respectivamente para 6h, 18h, 20h, 22h e 24h); o mesmo foi observado na categoria difusa entre 18h e 24h (0-11,1%; 0-2,5%; 0; 0-2,4%, respectivamente para 18h, 20h, 22h e 24h).

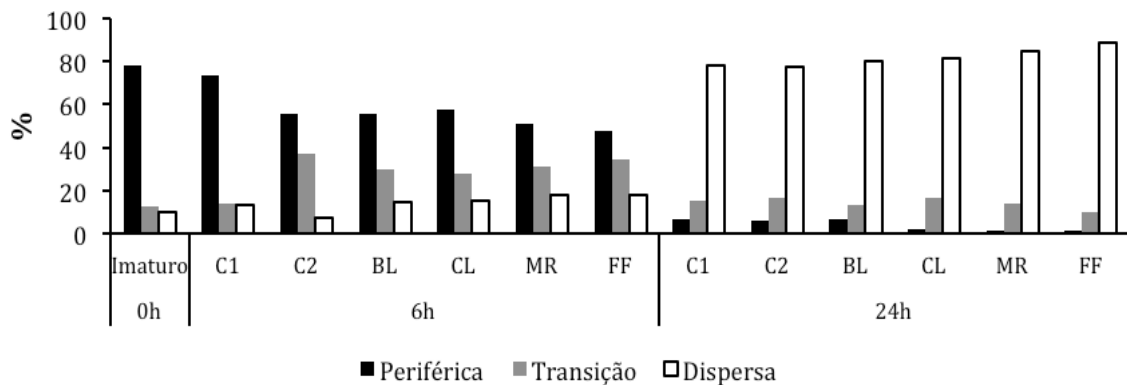
**Tabela 1.** Distribuição dos microfilamentos de actina em oócitos bovinos imaturos (0h: imediatamente após remoção do folículo ovariano) e em oócitos cultivados com inibidores da meiose durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por até mais 18 horas, em meio livre de inibidor.

Grupo	Duração	N	Distribuição dos microfilamentos de actina			
			Normal (Média±EPM)	Descontínua (Média±EPM)	Difusa (Média±EPM)	Ausente (Média±EPM)
Imaturo	0h	103	46,1±7,2	45,0±8,8	6,4±3,5 <sup>a</sup>	2,5±1,3
C1	6h	72	18,9±6,4	61,8±8,2	16,7±5,1 <sup>ab</sup>	2,6±2,6
C2		66	32,2±11,2	54,3±3,8	8,9±5,3 <sup>ab</sup>	4,5±4,5
BL		66	26,2±4,9	45,4±4,1	19,8±4,4 <sup>ab</sup>	8,5±6,3
CL		63	17,1±10,5	53,9±1,9	27,2±10,8 <sup>ab</sup>	1,8±1,8
MR		57	12,8±10,4	46,2±6,8	37,4±4,6 <sup>b</sup>	3,3±1,6
FF		65	26,1±12,4	57,9±12,7	8,1±4,6 <sup>a</sup>	7,9±6,2
C1	18h	80	61,1±1,7	37,7±2,8	1,2±1,2	0
C2		64	79,0±7,9	20,9±7,9	0	0
BL		72	48,1±19,4	36,5±20,5	11,1±2,8	4,1±4,1
CL		70	45,7±15,6	44,8±11,2	6,2±4,4	3,2±1,7
MR		77	48,7±18,3	41,0±17,4	6,6±2,7	3,6±2,0
FF		76	55,7±26,5	37,5±23,7	5,3±3,7	1,4±1,4
C1	20h	74	70,4±13,0	26,0±13,3	2,3±2,3	1,1±1,1
C2		80	85,5±5,7	7,6±5,9	2,5±2,5	6,3±4,6
BL		76	83,3±5,0	3,9±2,0	0	12,7±6,3
CL		81	79,9±8,2	6,1±2,3	2,5±1,3	11,4±5,9
MR		78	66,4±7,3	23,1±11,6	1,4±1,4	9,0±5,8
FF		75	73,3±5,4	16,3±6,6	4,0±0,1	6,4±6,4
C1	22h	67	88,1±0,9	11,8±0,9	0	0
C2		60	79,3±9,7	8,8±2,5	0	11,8±7,4
BL		60	88,1±9,9	8,4±6,4	0	3,5±3,5
CL		63	85,3±7,9	7,6±7,6	0	7,0±4,9
MR		61	85,5±9,4	1,9±1,9	0	12,5±10,4
FF		64	65,8±1,8	18,5±9,3	0	15,6±8,9
C1	24h	92	69,5±11,6	27,3±11,3	0	3,2±1,1
C2		83	84,2±2,6	10,8±2,3	0	4,9±1,9
BL		77	65,5±5,4	18,6±8,5	1,5±1,5	14,4±8,4
CL		84	77,2±6,6	15,3±6,0	0	7,5±5,0
MR		81	75,5±3,4	11,8±4,2	0	12,7±4,6
FF		92	67,6±10,9	23,2±9,2	2,4±1,4	6,7±1,7

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Normal: uma camada uniformemente corada de microfilamentos de actina, localizada imediatamente abaixo da membrana plasmática e formando um anel; Descontínua: interrupção da coloração do anel de actina; Difusa: distribuição difusa ou irregular dos microfilamentos de actina, fracamente corados; Ausente: ausência do anel de actina. C1 (controle 1): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; C2 (controle 2): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 6h em Minitub e por até 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; BL: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA e 100 µM Butirolactona-I por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; CL: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA, 100 µM Forskolina e 500 µM IBMX por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e 20 µM Cilostamida por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; MR: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA e 100 mM Milrinona por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 18h em incubadora 5%

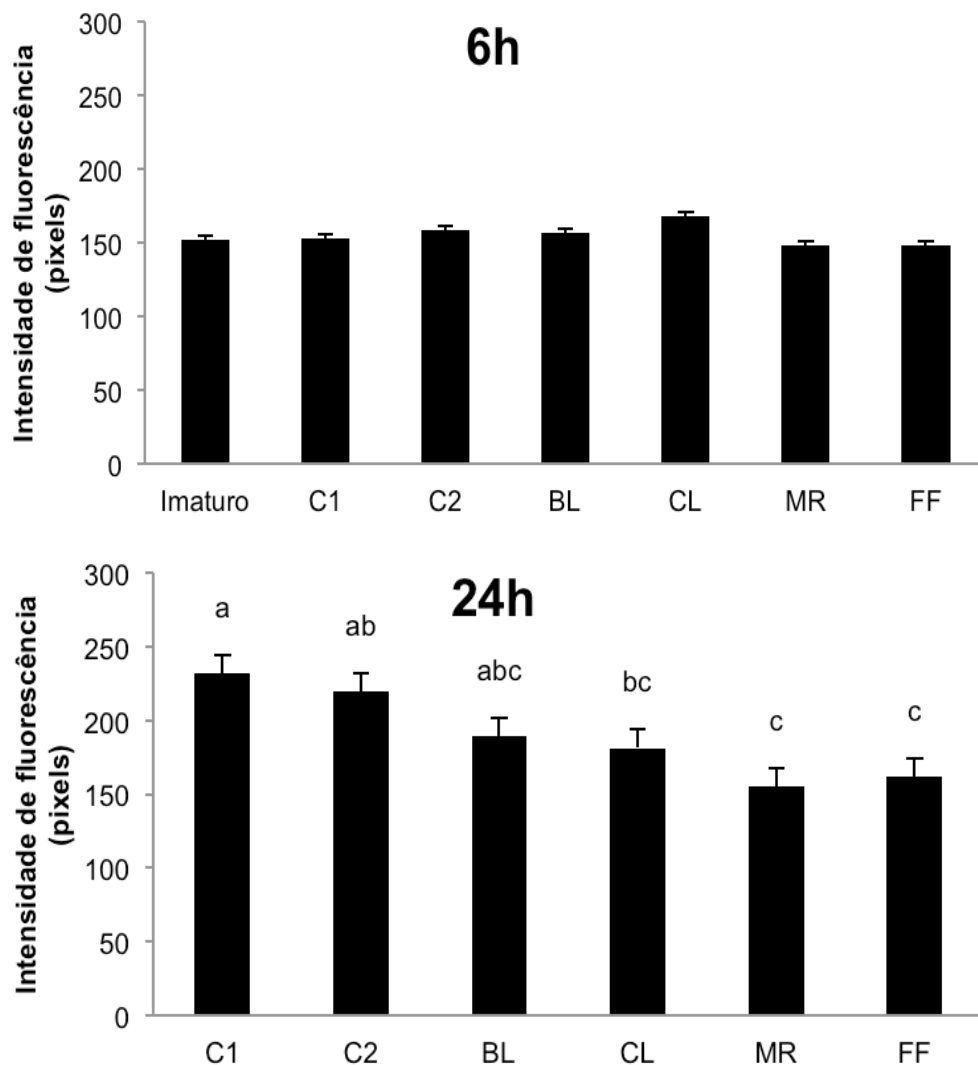
CO<sub>2</sub>; FF: oócitos pré-maturados em fluido folicular puro acrescido de antibiótico (75 µg/mL de penicilina/estreptomicina) por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA em incubadora 5% CO<sub>2</sub>.

Com relação à distribuição citoplasmática de mitocôndrias, a maioria (77,8%) encontrava-se localizada na periferia dos oócitos imaturos avaliados imediatamente após a aspiração folicular, sendo semelhante ( $P>0,05$ ) ao observado nos demais grupos tratados com inibidores da meiose após o transporte por 6h (47,8%-73,3%). Após as 24h de MIV, não houve diferença ( $P>0,05$ ) entre os grupos experimentais, com a maioria classificada com localização dispersa (77,7%-89,0%). Os resultados estão sumarizados na Figura 11.



**Figura 11.** Distribuição citoplasmática de mitocôndrias em oócitos bovinos cultivados com inibidores da meiose durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por mais 18 horas, em meio livre de inibidor. Distribuição de mitocôndrias em oócitos bovinos imaturos imediatamente após a aspiração folicular (0h), após o transporte (6h) com inibidores da maturação nuclear e após a conclusão do cultivo de maturação *in vitro* (24h). Distribuição Periférica: mitocôndrias distribuídas principalmente na região cortical do citoplasma; Dispersa: mitocôndrias distribuídas por todo o citoplasma; Transição: mitocôndrias posicionadas entre classificação periférica e dispersa. C1 (controle 1): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; C2 (controle 2): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 6h em Minitub e por até 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; BL: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA e 100 µM Butirolactona-I por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; CL: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA, 100 µM Forskolina e 500 µM IBMX por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e 20 µM Cilostamida por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; MR: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA e 100 mM Milrinona por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; FF: oócitos pré-maturados em fluido folicular puro acrescido de antibiótico (75 µg/mL de penicilina/estreptomicina) por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA em incubadora 5% CO<sub>2</sub>. Dentro de cada momento de avaliação, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Tukey ( $P<0,05$ ).

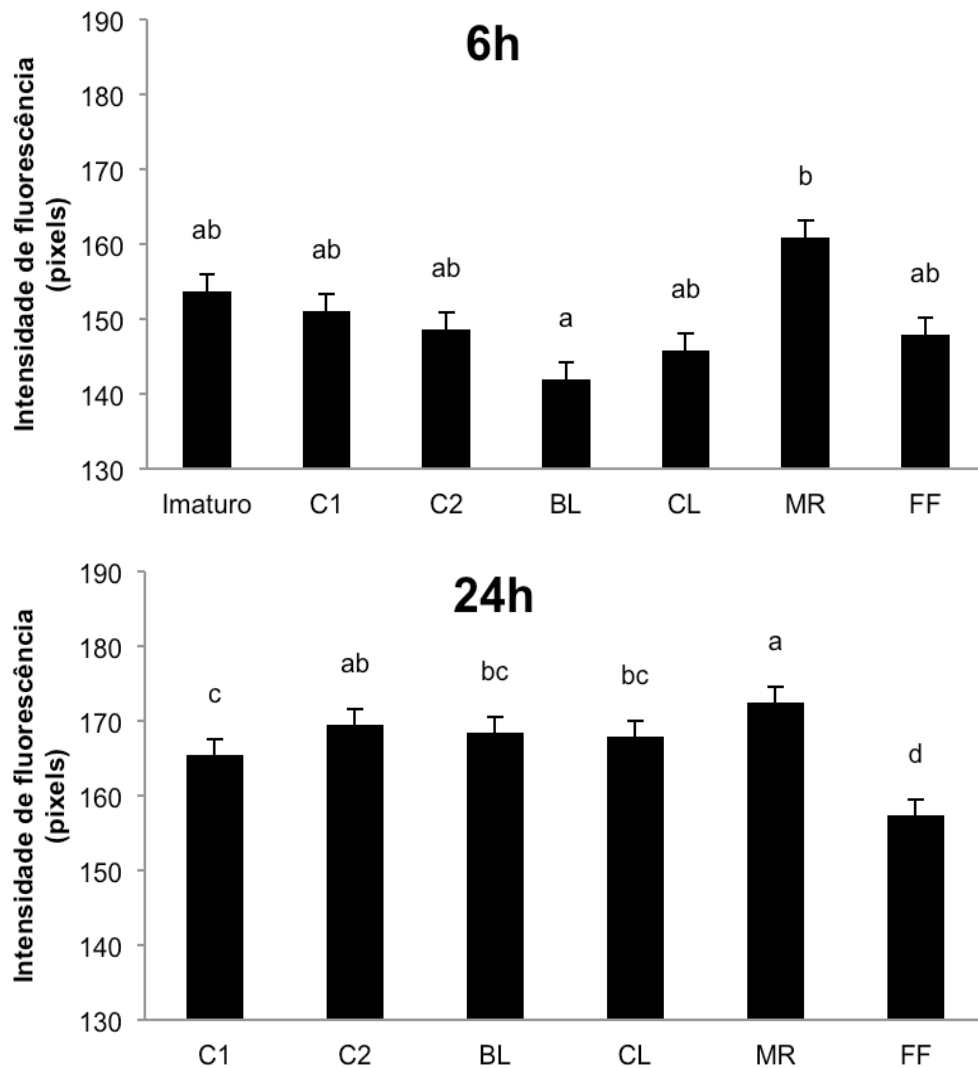
O potencial de membrana mitocondrial, mensurado em intensidade de fluorescência, está apresentado na Figura 12. Os resultados não diferiram ( $P>0,05$ ) entre os grupos após o transporte por 6h, quando comparados com oócitos imaturos, ou seja, aqueles avaliados imediatamente após a aspiração folicular (148,3-168,1). Após 24h de MIV, oócitos dos grupos C1 (231,9) e C2 (219,8) apresentaram maior ( $P<0,05$ ) potencial de membrana mitocondrial quando comparados aos grupos MR (155,2) e FF (161,9), porém não diferiram de BL (189,5%). Oócitos dos grupos C2 e BL não diferiram ( $P>0,05$ ) de CL (181,2), e oócitos dos grupos BL e CL não diferiram ( $P>0,05$ ) daqueles dos grupos MR e FF.



**Figura 12.** Potencial de membrana mitocondrial (quantificado em intensidade de fluorescência) de oócitos bovinos cultivados com inibidores da meiose durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por mais 18 horas, em meio livre de inibidor. C1 (controle 1): oócitos

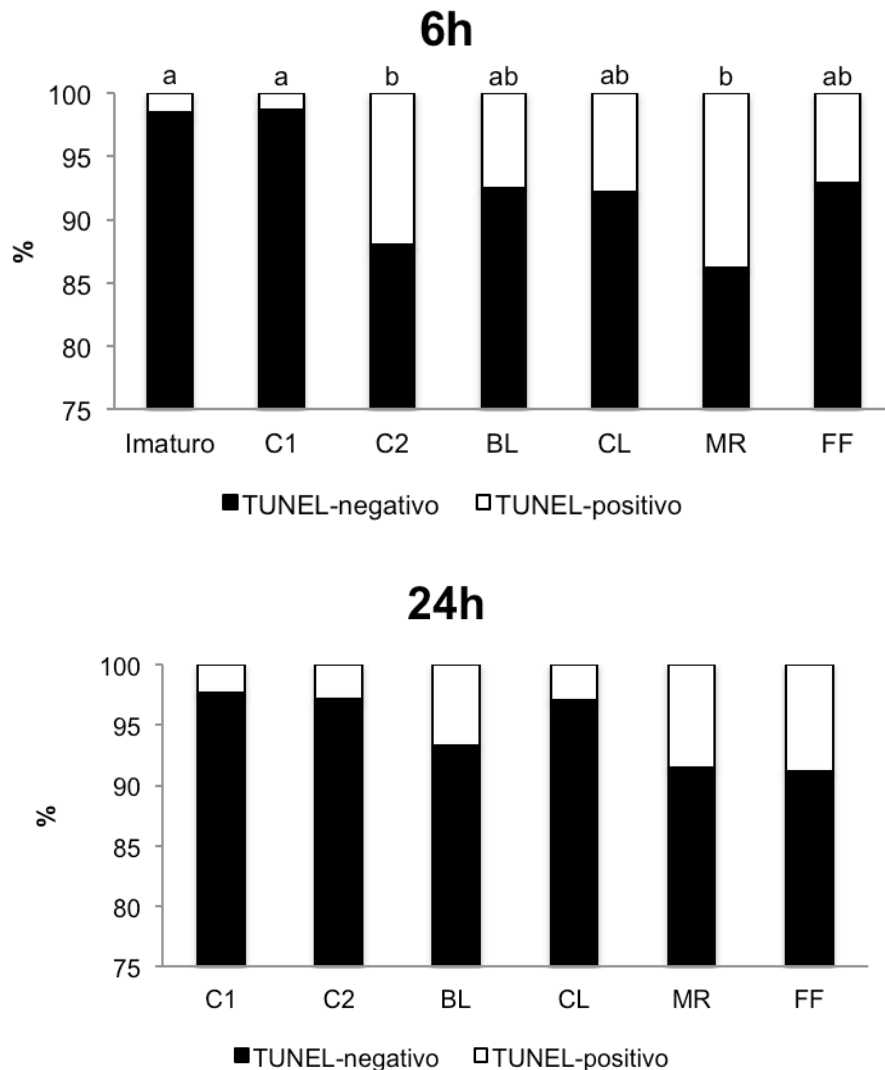
maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; C2 (controle 2): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 6h em Minitub e por até 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; BL: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA e 100 µM Butirolactona-I por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; CL: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA, 100 µM Forskolina e 500 µM IBMX por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e 20 µM Cilostamida por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; MR: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA e 100 mM Milrinona por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; FF: oócitos pré-maturados em fluido folicular puro acrescido de antibiótico (75 µg/mL de penicilina/estreptomicina) por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA em incubadora 5% CO<sub>2</sub>. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença entre os grupos pelo teste de Tukey (P<0,05).

A quantidade intracelular de ROS após 6h foi menor (P<0,05) em oócitos transportados com BL (141,9) em comparação com os do grupo MR (160,8). No entanto, ambos foram similares (P>0,05) aos demais tratamentos e aos oócitos imaturos (145,8-153,7). Ao final das 24h de MIV, oócitos do grupo MR (172,5) apresentaram maior (P<0,05) quantidade de ROS quando comparados àqueles dos grupos C1 (165,4), BL (168,4), CL (167,9) e FF (157,3), sendo semelhante (P>0,05) somente a C2 (169,5). Este último não diferiu (P>0,05) dos grupos BL e CL, que foram semelhantes (P>0,05) ao grupo C1. Os dados estão apresentados na Figura 13.



**Figura 13.** Concentrações intracelulares de espécies reativas do oxigênio (ROS) em oócitos bovinos cultivados com inibidores da meiose durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por mais 18 horas, em meio livre de inibidor. Concentração intracelular de ROS (em intensidade de fluorescência) em oócitos bovinos imaturos avaliados imediatamente após a aspiração folicular (0h), após o transporte (6h) com inibidores da maturação nuclear e após a maturação *in vitro* (24h). C1 (controle 1): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; C2 (controle 2): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 6h em Minitub e por até 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; BL: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA e 100 µM Butirolactona-I por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; CL: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA, 100 µM Forskolina e 500 µM IBMX por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e 20 µM Cilostamida por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; MR: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA e 100 mM Milrinona por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; FF: oócitos pré-maturados em fluido folicular puro acrescido de antibiótico (75 µg/mL de penicilina/estreptomicina) por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA em incubadora 5% CO<sub>2</sub>. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos pelo teste de Tukey (P<0,05).

A taxa de apoptose em oócitos imaturos (1,5%) e após 6h no grupo C1 (1,3%) foi menor ( $P < 0,05$ ) quando comparados com MR (13,8 %) e C2 (12,0%). No entanto, não diferiram ( $P > 0,05$ ) de BL (7,5%), CL (7,8%) e FF (7,1%). Após a MIV, não houve diferença na taxa de apoptose nos oócitos maduros (2,3%-8,8%). Os resultados estão apresentados na Figura 14.



**Figura 14.** Taxa de apoptose em oócitos bovinos cultivados com inibidores da meiose durante o transporte simulado por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por mais 18 horas, em meio livre de inibidor. Taxa de apoptose em oócitos bovinos imaturos avaliados imediatamente após a aspiração folicular (0h), após o transporte (6h) com inibidores da maturação nuclear e após a maturação *in vitro* (24h). TUNEL-positivo: células com fragmentação de DNA; TUNEL-negativo: células sem fragmentação de DNA. C1 (controle 1): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; C2 (controle 2): oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 6h em Minitub e por até 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; BL: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA e 100 µM Butirolactona-I por 6h em Minitub e

maturados in vitro em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; CL: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA, 100 µM Forskolina e 500 µM IBMX por 6h em Minitub e maturados in vitro em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e 20 µM Cilostamida por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; MR: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA e 100 mM Milrinona por 6h em Minitub e maturados in vitro em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; FF: oócitos pré-maturados em fluido folicular puro acrescido de antibiótico (75 µg/mL de penicilina/estreptomicina) por 6h em Minitub e maturados in vitro em meio MIV suplementado com 0,6% BSA em incubadora 5% CO<sub>2</sub>. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos pelo teste Qui-quadrado (P<0,05).

#### 4. DISCUSSÃO

Oócitos imaturos (0h) apresentaram taxa de 84,9% de VG e, após 6h de maturação, 47,5% dos oócitos do grupo controle (C1) já haviam retomado a meiose. Estes resultados diferem daqueles reportados por Adona et al. (2006), que verificaram 100% de oócitos em VG para os dois momentos avaliados. Essa diferença pode ser devida aos animais utilizados em cada experimento. A GVBD se inicia após 6h de MIV e é máxima após 8h (Li et al., 2005), corroborando com o presente estudo, onde se verificou mais de 45% dos oócitos em GVBD após 6h, em todos os grupos.

Os oócitos dos grupos BL e CL apresentaram um retardo na retomada da meiose (estadio intermediário) quando comparados com o grupo transportado em meio de maturação na ausência de inibidores (C2), indicando que estes não deixaram a meiose acelerar como o sistema de transporte na ausência deles e eles foram capazes de manter a progressão da meiose semelhante a do grupo controle que não foi submetido ao transporte (C1). Por esses resultados, parece que o cultivo de maturação em incubadora portátil promove uma aceleração na retomada da meiose, o que pode prejudicar a maturação oocitária.

Oócitos do grupo CL, adaptado do sistema SPOM (Albuz et al., 2010), completaram a maturação no mesmo tempo que os demais e apresentaram resultados semelhantes ao grupo BL para todos os parâmetros avaliados, apesar do maior período de exposição aos inibidores da meiose. Portanto, mesmo durante a exposição prolongada à cilostamida, um inibidor da PDE 3, os oócitos foram capazes de retomar e concluir a meiose, atingindo o estágio de MII. De acordo Albuz

et al. (2010), a MIV na presença deste inibidor melhora o potencial dos oócitos para o desenvolvimento embrionário.

Sabe-se que a butirolactona-I é capaz de bloquear a meiose de forma reversível e que, após o bloqueio, o período de MIV é mais acelerado do que o de oócitos não tratados (Hashimoto et al., 2002). Em nosso estudo, a inibição meiótica não interferiu no período necessário para a maturação nuclear, sendo semelhante aos grupos controle. O mesmo foi relatado com o bloqueio meiótico por 6h com butirolactona-I, após a remoção do inibidor a progressão inicial da meiose foi acelerada, porém após 18h de cultivo estava equiparada entre os grupos (Adona et al., 2006).

A expansão das células do cumulus não é necessária para a progressão da maturação nuclear (Sirard, 1990), porém são eventos que ocorrem de maneira simultânea. Oócitos imaturos apresentam cumulus compacto e sem expansão, sendo que a expansão só é observada ao final da MIV (Oliveira e Silva et al., 2011), tal como foi observado no presente estudo. Entretanto, oócitos cultivados em fluido folicular demonstraram aumento no escore de expansão das células do cumulus, em comparação com os demais tratamento que não influenciaram no grau de expansão. O fluido folicular induz a expansão das células do cumulus (Sirard, 1990; Romero-Arredondo e Seidel Jr, 1994).

Os microfilamentos são os maiores componentes do citoesqueleto e auxiliam na divisão celular (Kim et al., 2000). Eles estão dispostos na região cortical do oócito bovino e, durante a extrusão do corpúsculo polar, uma grande parte dos microfilamentos de actina é eliminada no corpúsculo polar (Li et al., 2005). Nossos resultados demonstraram que a maior parte dos oócitos avaliados apresentou distribuição normal dos microfilamentos de actina, dispostos na região cortical do oócito e foi possível verificar a proximidade destes com os cromossomos e com o corpúsculo polar. Foi possível verificar que alguns oócitos apresentaram alterações na disposição dos microfilamentos de actina, contrário ao descrito por Adona et al. (2008) que não observaram alterações em nenhum momento da MIV de oócitos bloqueados.

Após o transporte, os oócitos do grupo MR apresentaram maior quantidade de oócitos com os microfilamentos dispostos de forma difusa, diferindo de oócitos

imaturos e dos oócitos transportados com fluido folicular. Alterações nos microfilamentos representadas por pequenos agrupamentos de actina foram anteriormente reportadas, porém não foram prejudiciais ao desenvolvimento embrionário (Naruse et al., 2012). Adicionalmente, oócitos deste grupo apresentaram maior taxa de apoptose e maior quantidade intracelular de ROS, que se manteve até o final da MIV. As mitocôndrias são a maior fonte de geração de ROS (Pandey et al., 2010), porém, o aumento de ROS não pode ser justificado pela atividade mitocondrial no presente estudo, pois ao final da MIV foi verificado menor potencial de membrana mitocondrial neste grupo. Este achado indica menor competência destes oócitos, já que a atividade mitocondrial é positivamente correlacionada com a competência oocitária (Jeseta et al., 2014). No entanto, as alterações no citoesqueleto podem ser relacionadas com a ocorrência de apoptose, o que foi previamente sugerido para oócitos submetidos ao estresse térmico (Roth e Hansen, 2005).

Foi anteriormente demonstrado que a suplementação do meio de MIV com fluido folicular oriundo de folículos grandes não altera a quantidade intracelular de ROS dos oócitos cultivados (Park et al., 2014). No entanto, pudemos verificar que o uso de fluido folicular no transporte de oócitos por 6 horas reduziu significativamente a quantidade de ROS ao final da MIV em comparação com os demais grupos, apesar desta redução não ter sido tão evidente após as 6h. Porém, neste grupo também foi verificada uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial no final da MIV, o que pode, conseqüentemente, ter provocado a menor geração de ROS em decorrência de uma possível menor atividade metabólica celular.

Em oócitos imaturos, as mitocôndrias estão predominantemente dispostas na periferia do oócito e, ao final da maturação, encontram-se dispersas pelo ooplasma (Adona et al., 2008; Oliveira e Silva et al., 2011). Este padrão de distribuição também foi observado nos tratamentos empregados, demonstrando o adequado reposicionamento desta organela.

## 5. CONCLUSÃO

A adição de inibidores da meiose (butirolactona-I, IBMX associado a forskolina e fluido folicular), com exceção da milrinona, ao meio de transporte de oócitos bovinos permite um transporte adequado por 6h, proporcionando condições de maturação do oócito semelhante à obtida *in vitro* a partir de oócitos que não foram submetidos ao transporte. Visto que em comparação com o transporte na ausência de inibidores o transporte com BL reduziu a quantidade intracelular de ROS e os tratamentos BL, CL e FF resultaram em menor taxa de apoptose após o transporte.

## REFERÊNCIAS

ADONA, P. R.; LEAL, C. L. V. Effect of concentration and exposure period to butyrolactone I on meiosis progression in bovine oocytes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 58, n. 3, p. 354-359, 2006.

ADONA, P. R.; PIRES, P. R. L.; QUETGLAS, M. D.; SCHWARZ, K. R. L. LEAL, C. L. V. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. **Animal Reproduction Science**. v. 108, p. 49-65, 2008.

AGARWAL, A.; SAID, T. M.; BEDAIWY, M. A.; BANERJEE, J.; ALVAREZ, J. G. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. **Fertility and Sterility**. v. 86, n. 3, p. 1-10, 2006.

FERREIRA, E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; MEIRELLES, F. V.; FERRIANI, R. A.; NAVARRO, P. A. A. S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**. v. 71, p. 836-848, 2009.

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

GUÉRIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction**. v. 7, n. 2, p. 175-189, 2001.

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

JESETA, M.; KNITLOVA, D. C.; HANZALOVA, K.; HULINSKA, P.; HANULAKOVA, S.; MILAKOVIC, I.; NEMCOVA, L.; KANKA, J.; MACHATKOVA, M. Mitochondrial patterns in bovine oocytes with different meiotic competence related to their *in vitro* maturation. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 49, p. 469-475, 2014.

KIM, N. H.; CHO, S. K.; CHOI, S. H.; KIM, E. Y.; PARK, S. P.; LIM, J. H. The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes during *in vitro* maturation. **Zygote**. v. 8, p. 25-32, 2000.

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

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

MAO, L.; LOU, H.; LOU, Y.; WANG, N.; JIN, F. Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. **Reproductive BioMedicine Online**. v. 28, p. 284-299, 2014.

MAYES, M. A.; SIRARD, M. A. Effect of type 3 and type 4 phosphodiesterase inhibitors on the maintenance of bovine oocyte in meiotic arrest. **Biology of Reproduction**. v. 66, p. 180-184, 2002.

NARUSE, K.; IGA, K. SHIMIZU, M.; TAKENOUCI, N.; AKAGI, S.; SOMFAI, T.; HIRAO, Y. Milrinone treatment of bovine oocytes during *in vitro* maturation benefits production of nuclear transfer embryos by improving enucleation rate and developmental competence. **Journal of Reproduction and Development**. v. 58, n. 4, p. 476-483, 2012.

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

PANDEY, A. N.; TRIPATHI, A.; PREMKUMAR, K. V. Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 111, p. 521-528, 2010.

PARK, S. H.; CHO, H. S.; YU, I. J. Effect of bovine follicular fluid on reactive oxygen species and glutathione in oocytes, apoptosis and apoptosis-related gene expression of *in vitro*-produced blastocysts. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 49, p. 370-377, 2014.

ROMERO-ARREDONDO, A.; SEIDEL JR, G. E. Effects of bovine follicular fluid on maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**. v. 41, p. 383-394, 1994.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. **Reproduction**. v. 129, p. 235-244, 2005.

SIRARD, M. A. Temporary inhibition of meiosis resumption *in vitro* by adenylate cyclase stimulation in immature bovine oocytes. **Theriogenology**. v. 33, n. 4, 1990.

SOMFAI, T.; KIKUCHI, K.; KANEDA, M.; AKAGI, S.; WATANABE, S.; MIZUTANI, E.; HARAGUCHI, S.; DANG-NGUYEN, T. Q.; INABA, Y.; GESHI, M.; NAGAI, T. Cytoskeletal abnormalities in relation with meiotic competence and ageing in porcine and bovine oocytes during *in vitro* maturation. **Journal of Veterinary Medicine**. v. 40, p. 335-344, 2011.

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

THOMAS, R. E.; THOMPSON, J. G.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B. Effect of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors during *in vitro* maturation of bovine oocytes on meiotic and developmental capacity. **Biology of Reproduction**. v. 71, p. 1142-1149, 2004.

VANDERHYDEN, B. C.; CARON, P. J.; BUCCIONE, R.; EPPIG, J. J. Developmental pattern of the secretion of cumulus expansion-enabling factor by mouse oocytes and the role of oocytes in promoting granulosa cell differentiation. **Developmental Biology**. v. 140, p. 307-317, 1990.

### **CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO A PARTIR DE OÓCITOS BOVINOS TRANSPORTADOS COM INIBIDORES DA MEIOSE E DESTINADOS A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES**

**RESUMO** – O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da inibição da meiose com inibidores farmacológicos ou biológicos durante o transporte de oócitos bovinos por 6 horas sobre a competência para o desenvolvimento e qualidade dos embriões produzidos. Para tanto, o meio de transporte de oócitos foi suplementado com butirolactona-I (BL), milrinona (MR), IBMX e forskolina (CL) ou fluido folicular puro (FF) e o meio de maturação somente do grupo transportado com IBMX e forskolina foi suplementado com cilostamida. Os oócitos foram incubados em incubadora portátil (Minitub®) para simulação de transporte, durante 6h. Posteriormente, foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV) até completar 24h e, em seguida, foram fecundados e os prováveis zigotos foram cultivados *in vitro* durante 7 dias. Foi feita a avaliação da taxa de clivagem (72 hpi) e do desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos (168 hpi), sendo que a qualidade dos embriões foi avaliada pela contagem do número total de células e taxa de apoptose, assim como pela mensuração da atividade das caspases. A taxa de clivagem foi maior ( $P < 0,05$ ) para o grupo Contr SFB (84,5%) quando comparada aos demais (59,6%-70,9%). O desenvolvimento embrionário do grupo Contr SFB (39,8%) foi maior ( $P < 0,05$ ) quando comparado a Contr Transp (22,6%) e MR (21,6%) e todos estes foram semelhantes ( $P > 0,05$ ) aos demais (23,6%-28,7%). O número total de células em embriões do grupo Contr SFB (85,2) foi maior ( $P < 0,05$ ) do que os dos grupos Contr BSA (53,6), Contr Transp (55,5), BL (58,3), CL (57,9) e MR (59,1), e todos foram semelhantes ( $P > 0,05$ ) aos do grupo FF (67,7). A taxa de apoptose avaliada pelo ensaio TUNEL não diferiu ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos (12,3%-15,7%), assim como a atividade das caspases que não apresentou diferença ( $P > 0,05$ ) entre os grupos experimentais (139,0-152,4). A adição de inibidores da meiose (butirolactona-I, IBMX associado à forskolina e fluido folicular), com exceção da milrinona, ao meio de transporte de oócitos bovinos permite um transporte adequado por 6h, proporcionando condições de maturação e aquisição da

competência do oócito que permitem uma produção embrionária semelhante à obtida *in vitro* a partir de oócitos que não foram submetidos ao transporte.

**Palavras-chave:** produção *in vitro*, inibição da meiose, transporte de oócitos

## 1. INTRODUÇÃO

O ambiente folicular é responsável tanto pelo bloqueio quanto pela retomada da meiose oocitária (Gilchrist, 2011). As células foliculares atuam de forma a proporcionar a manutenção do oócito em prófase I (Mehlmann, 2005) pelos altos níveis de monofosfato de adenosina cíclica (AMPc) no interior do oócito (Gilchrist, 2011). A retomada da meiose é devida ao decréscimo dos níveis de AMPc (Dekel, 2005) a qual, *in vitro*, ocorre de forma espontânea, após a remoção do oócito do ambiente folicular devido à aspiração folicular (Bilodeau-Goeseels, 2011). Esta retomada precoce da meiose (Blondin et al., 1997) sinaliza o início do processo de maturação oocitária *in vitro*, porém, em situações onde o oócito é transportado da fazenda até o laboratório em incubadora portátil, sem controle de atmosfera gasosa, a capacitação oocitária pode ser comprometida.

Portanto, na tentativa de aumentar a competência dos oócitos obtidos a campo para finalidade de produção *in vitro* de embriões, podem ser utilizados inibidores da maturação nuclear durante o transporte destes oócitos. Isto porque o bloqueio meiótico aumenta a competência dos oócitos para o desenvolvimento (Hashimoto et al., 2002), uma vez que os baixos níveis de AMPc durante o bloqueio permitem que o oócito tenha mais tempo para passar pelo processo de maturação citoplasmática (Guixue et al., 2001), conseqüentemente acumulando moléculas importantes para o desenvolvimento embrionário inicial, o que pode melhorar a eficiência da produção *in vitro* de embriões (Bilodeau-Goeseels, 2012).

Os inibidores da meiose atuam de diferentes maneiras, podendo agir nas proteínas cinases ou nas fosfodiesterases (PDE), que são enzimas responsáveis pelo controle do AMPc, ou ainda na ativação do fator promotor da maturação (MPF). Inibidores de ciclinas dependentes de cinases (CDK) são utilizados para prevenir a retomada precoce da meiose, permitindo a maturação citoplasmática adequada, o que garante a competência para a fertilização e posterior desenvolvimento embrionário (Knockaert et al., 2002). A butirolactona-I, um inibidor de CDK, demonstrou-se capaz de bloquear a meiose em oócitos bovinos de forma reversível

por inibir a ativação do MPF, melhorando a competência dos oócitos (Kubelka et al., 2000).

Inibidores de PDE são capazes de bloquear a meiose, uma vez que esta é responsável pela degradação do AMPc (Albuz et al., 2010; Sasseville et al., 2009; Thomas et al., 2002). Cilostamida e milrinona são inibidores específicos das PDE tipo 3, a família das PDE expressa predominantemente nos oócitos (Sasseville et al., 2009). A adição de cilostamida na maturação retarda a diminuição dos níveis de AMPc (Albuz et al., 2010). O uso de milrinona em oócitos proporciona níveis satisfatórios de competência para o desenvolvimento embrionário após transferência nuclear (Naruse et al., 2012). Albuz e colaboradores (2010) propuseram um sistema de maturação *in vitro* (MIV) denominado SPOM (“*simulated physiological oocyte maturation*”) que consiste em uma fase de pré-maturação na presença de IBMX e forskolina por 1 a 2 horas, com o objetivo de aumentar rapidamente as concentrações de AMPc no oócito, seguida por um período mais longo de MIV, na presença de cilostamida, visto que a exposição contínua dos oócitos a um inibidor da PDE 3 melhora o potencial destes oócitos para o desenvolvimento embrionário. O SPOM foi capaz de aumentar a taxa de fertilização e de blastocistos quando comparado à MIV tradicional.

O fluido folicular contém fatores que inibem a retomada da meiose e pode ser utilizado como alternativa biológica para a inibição da meiose (Sirard et al., 1998). Foi observada inibição da maturação nuclear de oócitos maturados *in vitro* em meio suplementado com fluido folicular obtido de folículos logo após o pico de LH. No entanto, o fluido folicular obtido de folículos após 8h e 20h do pico de LH não foi capaz de inibir a meiose (Romero-Arredondo e Seidel Jr, 1994). Além disso, a suplementação do meio de maturação com fluido folicular oriundo de folículos de tamanho médio e grande foi capaz de diminuir a taxa de apoptose (Park et al., 2014).

O presente trabalho foi delineado com o propósito de testar a hipótese de que a adição de inibidores biológicos ou farmacológicos da maturação nuclear ao meio de transporte de oócitos bovinos pode possibilitar condições adequadas de cultivo, levando à uma maior competência oocitária e, conseqüentemente, uma melhor produção e qualidade embrionária. Portanto, buscando a melhoria na produção *in*

*vitro* de embriões bovinos, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da inibição da meiose com inibidores farmacológicos (butirolactona-I, milrinona ou cilostamida) ou biológicos (fluido folicular) durante o transporte de oócitos bovinos por 6 horas sobre a competência no desenvolvimento embrionário e qualidade dos embriões produzidos.

## **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. Materiais plásticos e tubos foram obtidos da empresa Corning Inc. (Acton, MA, USA).

### **Obtenção e seleção de oócitos**

Foram aspirados folículos de 3-8 mm de ovários de bovinos provenientes abatedouro, não excedendo o limite de 4 horas desde o abate até o início das aspirações. Durante a seleção, os oócitos foram mantidos em fluido folicular centrifugado acrescido de antibiótico para prevenir a retomada imediata da meiose. O fluido folicular foi obtido em cada rotina através da centrifugação do sobrenadante por 5 minutos à 12500xg, em seguida, o sobrenadante foi recuperado e acrescido de 75 µg/mL de penicilina/estreptomicina. Os oócitos com cumulus compacto contendo pelo menos quatro camadas de células e de aparência saudável (citoplasma de granulação homogênea) foram selecionados para o cultivo. O período de tempo da seleção até o início do cultivo foi de aproximadamente 1 hora.

### **Simulação de transporte e cultivo de maturação *in vitro* de oócitos**

Os oócitos selecionados foram submetidos à simulação de transporte anteriormente ao cultivo de maturação *in vitro*. Para tanto, foram acondicionados em criotubos contendo 100 µL de meio de transporte (25-30 oócitos/gota), composto por TCM-199 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado com 0,2 mM de

piruvato, 25 mM de bicarbonato de sódio, 75 µg/mL de amicacina, 0,5 µg/mL de FSH (Folligon®, MSD Animal Health, São Paulo, Brasil), 100 UI/mL de hCG (Vetecor®, Hertape Calier, Juatuba, Brasil) e 0,3% de BSA, além de inibidor da meiose (descrição dos grupos no item Delineamento Experimental). O meio foi coberto com óleo mineral e os criotubos foram gaseificados com mistura gasosa contendo 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub>, sendo então acondicionados em incubadora portátil (Minitub®) a 38,5°C durante 6 horas.

Após a simulação de transporte em incubadora portátil, os oócitos foram lavados para completa remoção dos inibidores e foram transferidos para microgotas de 100 µL (25-30 oócitos/gota) de meio de maturação, composto por TCM-199 suplementado com 0,2 mM de piruvato, 25 mM de bicarbonato de sódio, 75 µg/mL de amicacina, 0,5 µg/mL de FSH, 100 UI/mL de hCG e 0,6% de BSA ou 10% de SFB (de acordo com o grupo experimental), cobertas com óleo mineral. O cultivo de maturação foi conduzido em incubadora com temperatura de 38,5°C, máxima umidade e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar por 18 horas. Desta forma, o tempo total de cultivo de maturação de 24 horas (6 horas em transporte simulado mais 18 horas em incubadora).

### **Fertilização e cultivo embrionário *in vitro***

A FIV foi realizada após o término do cultivo de maturação (24 horas), utilizando-se o sêmen de um único touro Nelore da mesma partida e com fertilidade provada para produção *in vitro*. A palheta de sêmen foi descongelada à temperatura de 36°C por 40 segundos e os espermatozoides vivos foram separados do diluidor por centrifugação em gradiente de densidade descontínua de Percoll (GE Healthcare Bio-Sciences, Suécia) em duas fases (90% e 45%), a 2500xg durante 7 minutos em temperatura ambiente. O sedimento recuperado foi avaliado quanto ao volume, concentração e motilidade espermática. A concentração final foi ajustada para 25x10<sup>6</sup> espermatozoides vivos por mL de meio de fecundação (TALP-FIV) contendo 10 µg/mL de heparina e 4 µL/mL da solução de PHE (1 mM de hipotaurina, 2 mM de penicilamina e 250 mM de epinefrina). Os oócitos foram lavados duas vezes em meio B-199, e uma vez em meio TALP-FIV, sendo então adicionados 25 oócitos por microgota. Subseqüentemente, foram inseminados com aproximadamente 100x10<sup>3</sup>

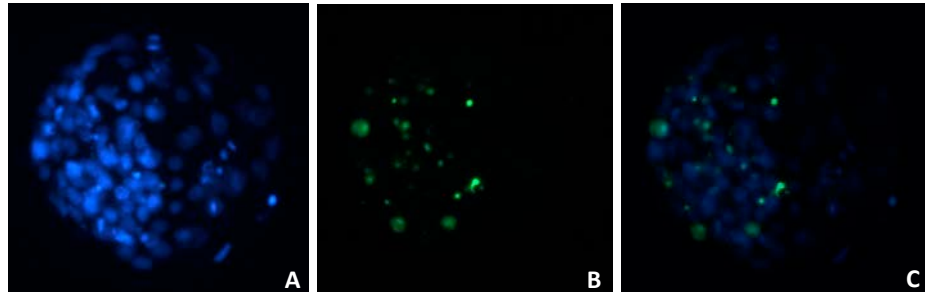
espermatozoides por microgota de 100  $\mu$ L de meio TALP-FIV designada a cada grupo experimental e incubados a 38,5°C por 24 horas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar.

O cultivo embrionário foi realizado em microgotas de 100  $\mu$ L de meio *Synthetic Oviduct Fluid* (SOF) 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, 0,5% de BSA e 2,5% de SFB, recobertas com óleo mineral, à temperatura de 38,5°C em incubadora com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar. Com 72 horas pós-inseminação (hpi), 50% do meio de cultivo foi renovado. A clivagem foi avaliada 72 hpi e o desenvolvimento embrionário 168 hpi (dia 7), quando os mesmos foram avaliados quanto ao número de células totais, taxa de células em apoptose e atividade das caspases.

#### **Determinação do número total de células e taxa de apoptose**

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 fixados em solução de paraformaldeído 4%, a temperatura ambiente por 1 hora e, em seguida, foram permeabilizados em solução de Triton X-100 0,5% em citrato de sódio 0,1% por 30 minutos em temperatura ambiente. Os embriões 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  $\mu$ L 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 embriões do controle negativo foram incubados na ausência da enzima. Após a reação TUNEL, os embriões foram incubados com Hoechst 33342 (1  $\mu$ g/mL) por 15 min em temperatura ambiente. Em seguida, foram montadas as lâminas com glicerol e os embriões foram avaliados em microscópio invertido equipado com epifluorescência (Olympus IX51; excitação 510-550 nm e emissão 590 nm). Foi realizada a contagem do número de células com fragmentação de DNA (células TUNEL positivas: fluorescência verde ou amarela

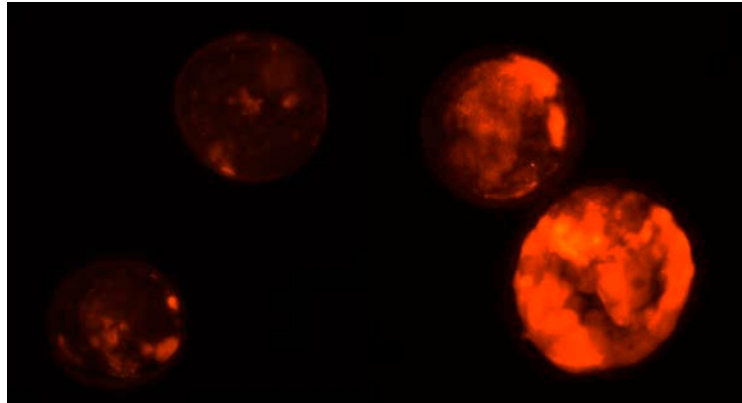
pontual dentro do núcleo) e do número total de células (fluorescência azul) pela coloração com Hoechst 33342 (Figura 1).



**Figura 1.** Imagem ilustrativa de embrião bovino corado com a sonda fluorescente Hoechst 33342 para identificação dos núcleos e contagem do número total de células (em azul, A) e TUNEL para determinação das células em apoptose (em verde, B). Sobreposição das imagens em (C). Os embriões foram avaliados em microscopia de epifluorescência (excitação 510-550 nm e emissão 590 nm, aumento 20X).

### **Mensuração da atividade das caspases 3 e 7**

A mensuração da atividade das caspases 3 e 7 foi realizada nos blastocistos expandidos pela coloração com a sonda fluorescente do “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 incubados em 10  $\mu$ L da solução 30X Flica em câmara úmida à 37°C por 1 hora, no escuro. Em seguida, foram lavados na solução 1X *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; excitação de 550 nm e emissão de 595 nm; Figura 2). 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 2.** Imagem ilustrativa de embriões bovinos corados com a sonda fluorescente FLICA<sup>®</sup> e avaliados em microscopia de epifluorescência (excitação 510-550 nm e emissão 590 nm, aumento 20X). Maior intensidade de fluorescência indica maior atividade das caspases.

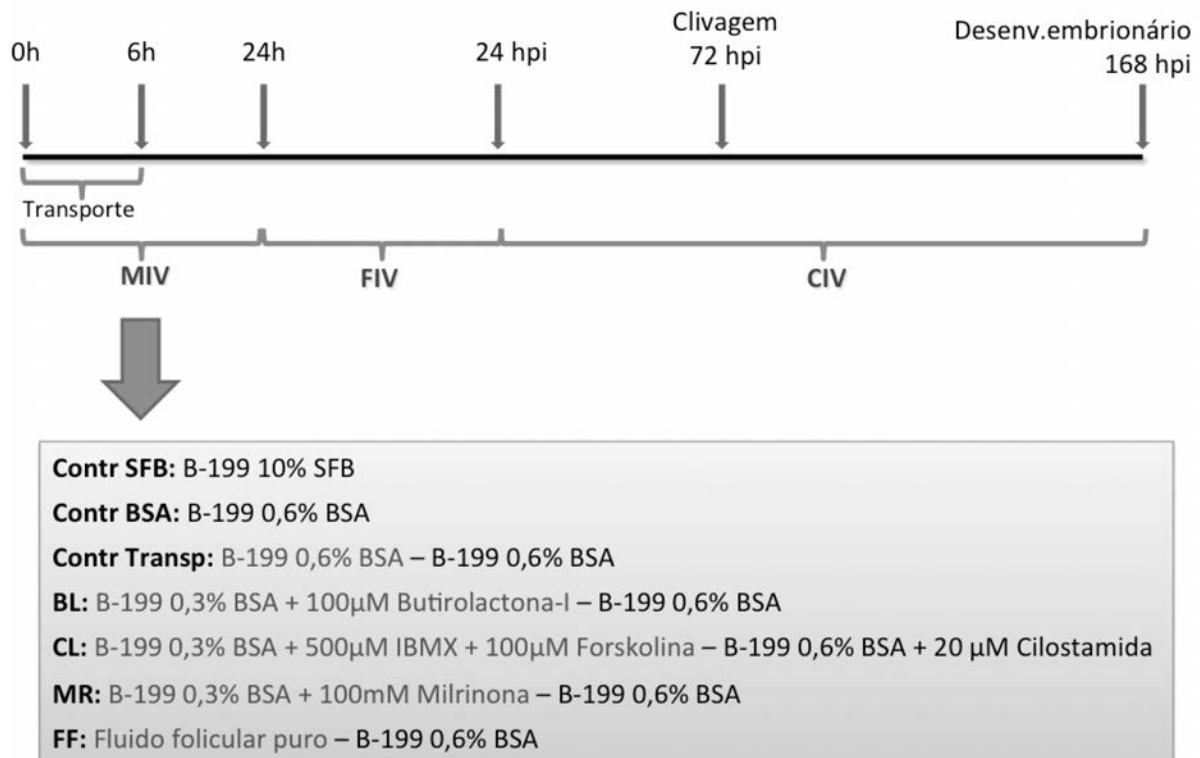
### **Delineamento experimental**

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do transporte simulado de oócitos bovinos em meio contendo inibidor da meiose sobre o desenvolvimento e qualidade dos embriões produzidos *in vitro*. Para a simulação de transporte em incubadora portátil (Minitub<sup>®</sup>) com temperatura de 38,5°C em ar atmosférico, os oócitos foram cultivados por 6 horas em meio de transporte na presença de inibidores da meiose, de acordo com os seguintes tratamentos: 1) 100 µM de butirolactona-I (BL); 2) 100 µM de forskolina + 500 µM IBMX (CL); 3) 100 mM de milrinona (MR); e 4) fluido folicular puro, acrescido de 75 µg/mL de penicilina/estreptomicina (FF). Posteriormente, os oócitos dos grupos BL, MR e FF foram lavados para completa remoção dos inibidores e foram maturados em meio de maturação em incubadora com temperatura de 38,5°C, máxima umidade e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar por 18 horas. Oócitos do grupo CL foram lavados para completa remoção dos inibidores e foram maturados em meio de maturação acrescido de 20 µM de cilostamida, sob as mesmas condições dos demais tratamentos. Desta forma, a duração total de cultivo de maturação foi de 24 horas (6 horas em transporte simulado mais 18 horas em incubadora).

Foram feitos 3 grupos controle: 1) oócitos maturados em meio suplementado com SFB (Contr SFB), em incubadora com temperatura de 38,5°C, máxima umidade e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar por 24 horas; 2) oócitos maturados em meio suplementado com BSA (Contr BSA), em incubadora com temperatura de 38,5°C,

máxima umidade e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar por 24 horas; e 3) oócitos maturados em meio suplementado com BSA (Contr Transp), em incubadora portátil (Minitub®) durante 6 horas (simulação de transporte), sendo então transferidos para incubadora com temperatura de 38,5°C, máxima umidade e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar por mais 18 horas (total de 24 horas).

Após o término do cultivo de maturação, os oócitos foram fecundados e os prováveis zigotos foram cultivados por 7 dias (D7). Foi avaliada a taxa de clivagem e de desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos, nos quais foram avaliados o número total de células, taxa de apoptose e atividade das caspases. O delineamento está representado na Figura 3.



**Figura 3:** Esquema representativo do delineamento experimental completo.

### Análise estatística

Neste estudo, os dados estão expressos na forma de média ± erro padrão (EPM). A porcentagem de blastocistos recuperados no Dia 7 foi calculada pela fração de oócitos cultivados que atingiram os determinados estádios de desenvolvimento. Como as porcentagens não obtiveram distribuição normal, os dados foram transformados utilizando arco seno raiz quadrada. 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). Diferenças com probabilidades (P) menores que 0,05 foram consideradas significativas.

### 3. RESULTADOS

Como demonstrado na Tabela 1, a taxa de clivagem foi maior ( $P < 0,05$ ) para o grupo Contr SFB (84,5%) quando comparada aos demais (59,6%-70,9%). O desenvolvimento embrionário do grupo Contr SFB (39,8%) foi maior ( $P < 0,05$ ) quando comparado a Contr Transp (22,6%) e MR (21,6%); no entanto, todos estes foram semelhantes ( $P > 0,05$ ) aos demais (23,6%-28,7%). Com relação ao número total de células, embriões do grupo Contr SFB (85,2) foram maiores ( $P < 0,05$ ) do que os dos grupos Contr BSA (53,6), Contr Transp (55,5), BL (58,3), CL (57,9) e MR (59,1), e nenhum diferiu ( $P > 0,05$ ) do grupo FF (67,7).

**Tabela 1.** Clivagem, desenvolvimento embrionário e número total de células de embriões bovinos produzidos a partir de oócitos cultivados com inibidores da meiose durante o transporte por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por 18 horas adicionais, em meio livre de inibidor.

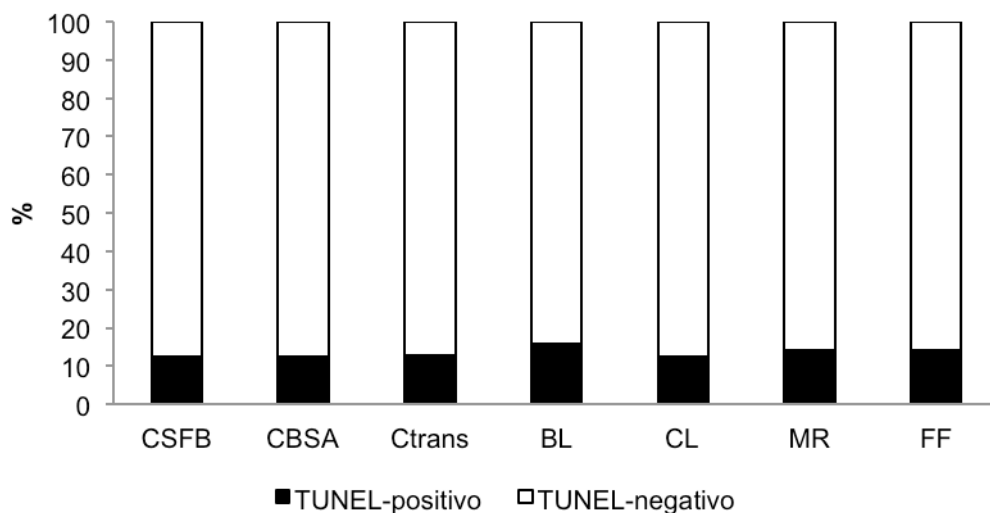
Grupo	Nº Oócitos	Clivagem (% Média ± EPM)	Blastocistos (% Média ± EPM)	Nº Células Totais (Média ± EPM)
Contr SFB	117	84,5 ± 2,7 <sup>a</sup>	39,8 ± 4,7 <sup>a</sup>	85,2 ± 5,6 <sup>a</sup>
Contr BSA	216	69,5 ± 2,9 <sup>b</sup>	28,7 ± 2,7 <sup>ab</sup>	53,6 ± 3,0 <sup>b</sup>
Contr Transp	210	70,9 ± 2,3 <sup>b</sup>	22,6 ± 3,4 <sup>b</sup>	55,5 ± 4,4 <sup>b</sup>
BL	207	68,9 ± 2,7 <sup>b</sup>	23,6 ± 3,3 <sup>ab</sup>	58,3 ± 3,0 <sup>b</sup>
CL	207	65,8 ± 2,7 <sup>b</sup>	24,0 ± 3,2 <sup>ab</sup>	57,9 ± 4,9 <sup>b</sup>
MR	208	64,5 ± 2,5 <sup>b</sup>	21,6 ± 2,3 <sup>b</sup>	59,1 ± 3,9 <sup>b</sup>
FF	220	59,6 ± 3,4 <sup>b</sup>	25,0 ± 4,0 <sup>ab</sup>	67,7 ± 4,2 <sup>ab</sup>

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Contr SFB: oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; Contr BSA: oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; Contr Transp : oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 6h em Minitub e por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; BL: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA e 100 µM Butirolactona-I por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; CL: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA, 100 µM Forskolina e 500 µM IBMX por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e 20 µM Cilostamida por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; MR: oócitos pré-maturados em meio de transporte

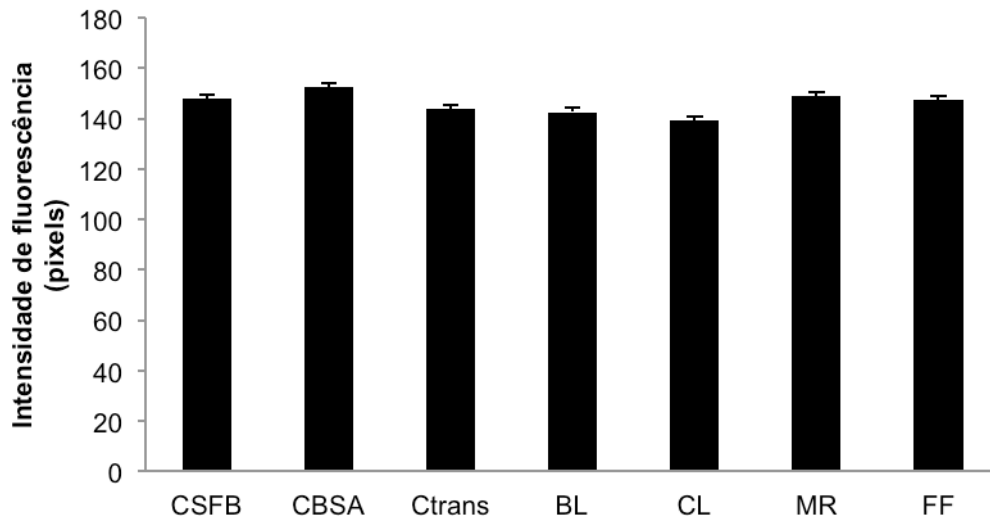
suplementado com 0,3% BSA e 100 mM Milrinona por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; FF: oócitos pré-maturados em fluido folicular puro acrescido de antibiótico (75 µg/mL de penicilina/estreptomicina) por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA em incubadora 5% CO<sub>2</sub>.

A taxa de apoptose estimada pelo ensaio TUNEL em blastocistos iniciais e blastocistos está demonstrada na Figura 4. Não houve diferença ( $P>0,05$ ) entre os grupos avaliados (12,3%-15,7%).

A atividade das caspases, demonstrada na Figura 5, não apresentou diferença ( $P>0,05$ ) entre os grupos experimentais (139,0-152,4).



**Figura 4.** Taxa de apoptose em embriões bovinos produzidos a partir de oócitos cultivados com inibidores da meiose durante o transporte por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por 18 horas adicionais, em meio livre de inibidor. Taxa de apoptose estimada pelo ensaio TUNEL em blastocistos iniciais e blastocistos no dia 7 de cultivo. Contr SFB: oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; Contr BSA: oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; Contr Transp : oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 6h em Minitub e por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; BL: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA e 100 µM Butirolactona-I por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; CL: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA, 100 µM Forskolina e 500 µM IBMX por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e 20 µM Cilostamida por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; MR: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA e 100 mM Milrinona por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; FF: oócitos pré-maturados em fluido folicular puro acrescido de antibiótico (75 µg/mL de penicilina/estreptomicina) por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA em incubadora 5% CO<sub>2</sub>. Não foram observadas diferenças entre os grupos ( $P>0,05$ ).



**Figura 5.** Atividade das caspases 3 e 7 em embriões bovinos produzidos a partir de oócitos cultivados com inibidores da meiose durante o transporte por 6 horas em incubadora portátil, seguido do cultivo de maturação *in vitro* por 18 horas adicionais, em meio livre de inibidor. Intensidade de fluorescência em blastocistos iniciais e blastocistos no dia 7 de cultivo. Contr SFB: oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; Contr BSA: oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>; Contr Transp : oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 6h em Minitub e por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; BL: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA e 100 µM Butirolactona-I por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; CL: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA, 100 µM Forskolina e 500 µM IBMX por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA e 20 µM Cilostamida por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; MR: oócitos pré-maturados em meio de transporte suplementado com 0,3% BSA e 100 mM Milrinona por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA por 18h em incubadora 5% CO<sub>2</sub>; FF: oócitos pré-maturados em fluido folicular puro acrescido de antibiótico (75 µg/mL de penicilina/estreptomicina) por 6h em Minitub e maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 0,6% BSA em incubadora 5% CO<sub>2</sub>. Não foram observadas diferenças entre os grupos (P>0,05).

#### 4. DISCUSSÃO

O transporte de oócitos do campo ao laboratório pode levar várias horas, podendo diminuir a viabilidade oocitária, uma vez que a remoção do oócito do ambiente folicular leva a retomada espontânea da meiose (Bilodeau-Goeseels, 2011; Guemra et al., 2014). O uso de inibidores da meiose durante o transporte de oócitos por um período prévio à maturação pode aumentar a competência oocitária para o desenvolvimento embrionário.

Neste estudo, foi feita a simulação do transporte de oócitos bovinos por 6h em meio de transporte com inibidores da meiose. A duração do transporte foi definida baseada na literatura em estudos sobre a eficácia dos diferentes inibidores da meiose utilizados e a duração do bloqueio. Como o IBMX mantém a meiose bloqueada por no máximo 8h (Barretto et al., 2007), foi determinada a duração do transporte em 6h. O meio de transporte de oócitos foi acrescido de hormônios, visto que a adição destes pode melhorar o potencial de desenvolvimento dos oócitos (Ponderato et al., 2002).

Os grupos BL, CL e FF apresentaram maior produção de blastocistos em comparação com os grupos MR e Contr Transp, equiparando a produção com os grupos Contr SFB e Contr BSA, os quais não foram submetidos ao transporte. Taxas de blastocistos semelhantes (27,3%) foram obtidas no transporte de oócitos bovinos pelo mesmo período com a mesma incubadora portátil, em meio suplementado com SFB, HEPES e hormônios (Silva et al., 2011). Desta forma, os resultados demonstram que o transporte por 6h em meio suplementado com BSA e com os inibidores BL ou CL, ou ainda em FF, pode proporcionar índices de produção de embriões *in vitro* compatíveis com aqueles produzidos em incubadora com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> em ar e em meio suplementado com SFB.

O grupo MR não se mostrou eficiente como suplemento do meio para o transporte de oócitos bovinos por 6h. Em estudo anterior, a milrinona utilizada na mesma dose como suplemento do meio de maturação melhorou a taxa de blastocistos após a transferência nuclear, porém, os autores utilizaram uma pré-maturação desses oócitos com a butirolactona-I (Naruse et al., 2012). Em nosso estudo, a milrinona, pode não ter sido eficiente para o transporte de oócitos por 6h, pois não foi associada com butirolactona-I durante a pré-maturação.

A pré-maturação com butirolactona-I por 24h é capaz de bloquear a meiose de forma reversível e manter o desenvolvimento embrionário subsequente (Adona e Leal, 2004; Adona et al., 2008). No presente estudo foi comprovado que ela foi eficaz para o transporte de oócitos bovinos por até 6h e foi capaz de melhorar o desenvolvimento embrionário quando comparada ao transporte em meio de maturação sem inibidores (Contr Transp). Estes resultados corroboram com resultados recentes de Guemra et al. (2014), que demonstraram o uso de

butirolactona-I para o transporte de oócitos bovinos por até 19h, o que permite o transporte por longas distâncias mantendo a qualidade do oócito, visto que a produção embrionária e taxa de prenhez não foram afetadas pelos tratamentos.

O sistema SPOM, proposto por Albus e colaboradores (2010), consiste em uma fase de pré-maturação na presença de IBMX e forskolina, com o objetivo de aumentar rapidamente as concentrações intraoocitárias de AMPc. Subsequentemente à pré-maturação, segue-se um período de maturação estendida (30h) em meio suplementado com cilostamida, um inibidor da PDE3 que é utilizado para aumentar a competência do oócito para o desenvolvimento embrionário. No presente estudo, o grupo CL foi adaptado deste protocolo e se mostrou efetivo para o transporte de oócitos por 6h, mantendo a qualidade dos embriões produzidos.

A manutenção de oócitos em fluido folicular é benéfica para a competência oocitária, provavelmente por proporcionar a manutenção dos altos níveis de AMPc no oócito (Ulloa et al., 2014). O transporte de oócitos bovinos em fluido folicular por 6h foi eficiente, como já demonstrado na literatura no cultivo de oócitos em tubos de reação por 6h antes da MIV em fluido folicular (Lehmkuhl et al., 2002) e no cultivo de oócitos em fluido folicular por 6h em banho-maria seguido de 18h de MIV (Rauber et al., 2003). Porém, o fluido folicular não apresentou resultados semelhantes em todas as rotinas, havendo grande variabilidade dos resultados (dados não demonstrados). Provavelmente isso se explica pelo fato do fluido ser de origem biológica e, assim como já demonstrado para o SFB, sujeito a variabilidade de resultados por diferenças na composição entre diferentes partidas, dificultando a repetibilidade dos resultados (Krisher et al., 1999).

O número total de células em blastocistos iniciais e blastocistos após 7 dias de cultivo foi semelhante entre os grupos Contr SFB e FF. Estes resultados corroboram com estudos anteriores, nos quais não foram constatadas diferenças no número total de células em blastocistos eclodidos oriundos de oócitos cultivados por 6 horas em fluido folicular proveniente de folículos de diferentes diâmetros (Rauber et al., 2003). Também não houve diferença na taxa de blastocistos produzidos a partir de oócitos maturados em meio suplementado com SFB e com fluido folicular oriundo de folículos de diferentes diâmetros (Park et al., 2014). Da mesma forma, não houve diferença no número total de células entre os grupos tratados com

inibidores da meiose e os grupos Contr BSA e Contr Transp, corroborando com os resultados de Varisanga et al. (2002) que não encontraram diferença no número total de células em embriões provenientes de oócitos maturados em incubadora portátil ou convencional. Todavia, a diferença verificada no número total de células dos blastocistos entre os grupos que foram suplementados com fluidos de origem biológica (soro e fluido folicular, respectivamente para os grupos Contr SFB e FF) e demais grupos suplementados com BSA, porém Watson et al. (2000) não encontraram diferenças no número total de células em embriões comparando a maturação em TCM-199 com 10% de SFB com a MIV em meio SOF acrescido de aminoácidos, no entanto, quando comparado com o meio SOF convencional houve redução no número de células. A ausência de diferença reportada nesse estudo pode ser devida a suplementação com aminoácidos no meio livre de SFB.

A pré-maturação com butirolactona-I não altera o número total de células em relação ao controle (Adona et al., 2008), corroborando com os resultados do nosso experimento para BL e para os demais inibidores utilizados. O sistema SPOM adaptado (grupo CL) não promoveu incremento no número total de células dos blastocistos, contrário ao sistema SPOM convencional que produziu blastocistos com 184 blastômeros (Albuz et al., 2010). Porém, esta diferença pode ser devida ao estágio de desenvolvimento dos blastocistos avaliados no nosso estudo, que foram blastocistos iniciais e blastocistos.

A apoptose em embriões, quando limitada, é importante para a remoção de células danificadas, permitindo o desenvolvimento embrionário subsequente. Porém, se intensa, pode resultar em bloqueio no desenvolvimento embrionário (Paula-Lopes e Hansen, 2002). A ocorrência de apoptose nos blastocistos, avaliada pelo ensaio TUNEL e pela mensuração da atividade das caspases, foi semelhante para todos os grupos avaliados, provavelmente porque, segundo Watson et al. (2000), os diferentes meios de maturação não têm grande influência na taxa de apoptose em embriões. A ativação de caspases resulta da apoptose mediada pela mitocôndria e tal atividade pode ser utilizada como marcador de apoptose em embriões. Porém, não pode ser correlacionada com a presença de fragmentação nuclear pela ocorrência temporal dos eventos, uma vez que a ativação de caspases ocorre precocemente na cascata da apoptose e a fragmentação nuclear somente no final

(Vandaele et al., 2007). Portanto, os tratamentos utilizados neste estudo não interferiram no início e nem no final da cascata apoptótica, indicando uma boa qualidade dos embriões produzidos nas condições propostas neste trabalho.

## **5. CONCLUSÃO**

A adição de inibidores da meiose (butirolactona-I, IBMX associado a forskolina e fluido folicular), com exceção da milrinona, ao meio de transporte de oócitos bovinos permite um transporte adequado por 6h, proporcionando condições de maturação que permitem uma produção embrionária semelhante à obtida *in vitro* a partir de oócitos que não foram submetidos ao transporte.

## REFERÊNCIAS

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

ADONA, P. R.; PIRES, P. R. L.; QUETGLAS, M. D.; SCHWARZ, K. R. L.; LEAL, C. L. V. Nuclear maturation kinetics and *in vitro* embryo development of cattle oocytes prematured with butyrolactone I combined or not combined with roscovitine. **Animal Reproduction Science**. v. 104, p. 389-397, 2008.

ALBUZ, F. K.; SASSEVILLE, M.; LANE, M.; ARMSTRONG, D. T.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Human Reproduction**. v. 25, n. 12, p. 2999-3011, 2010.

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

BILODEAU-GOESEELS, S. Cows are not mice: The role of cyclic AMP, phosphodiesterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**. v. 78, p. 734-743, 2011.

BILODEAU-GOESEELS, S. Bovine oocyte meiotic inhibition before *in vitro* maturation and its value to *in vitro* embryo production: Does it improve developmental competence? **Reproduction in Domestic Animals**. v. 47, p. 687-693, 2012.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; GUILBAULT, L. A.; SIRARD, M. A. *In vitro* production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology**. v. 47, n. p. 1061-1075, 1997.

DEKEL, N. Cellular, biochemical and molecular mechanism regulating oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 234, p. 19-25, 2005.

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

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

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

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

KNOCKAERT, M.; GREENGARD, P.; MEIJER, L. Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. **Trends Pharmacological Science**. v. 23, n. 9, p. 417-425, 2002.

KRISHER, R. L.; LANE, M.; BAVISTER, B. D. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. **Biology of Reproduction**. v. 60, p. 1345-1352, 1999.

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

LEHMKUHL, R. C.; MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A. D.; BARBIERI, D. P.; MACHADO, M. F.; RUBIN, M. I. B.; SILVA, C. A. M. Viabilidade de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular. **Ars Veterinaria**. v. 18, n. 3, p. 273-279, 2002.

MEHLMANN, L. M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction**. v. 130, p. 791-799, 2005.

NARUSE, K.; IGA, K.; SHIMIZU, M.; TAKENOUCI, N.; AKAGI, S.; SOMFAI, T.; HIRAO, Y. Milrinone treatment of bovine oocytes during *in vitro* maturation benefits production of nuclear transfer embryos by improving enucleation rate and developmental competence. **Journal of Reproduction and Development**. v. 58, n. 4, p. 477-483, 2012.

PARK, S. H.; CHO, H. S.; YU, I. J. Effect of bovine follicular fluid on reactive oxygen species and glutathione in oocytes, apoptosis and apoptosis-related gene expression of *in vitro*-produced blastocysts. **Reproduction in Domestic Animals**. p. 1-8, 2014.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 295, p. 37-42, 2002.

PONDERATO, N.; CROTTI, G.; TURINI, P.; DUCHI, R.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Embryonic and foetal development of bovine oocytes treated with a combination of butyrolactone I and roscovitine in an enriched medium prior to IVM and IVF. **Molecular Reproduction and Development**. v. 62, p. 513-518, 2002).

RAUBER, L. P.; ALVES, D. F.; FIGUEIRÓ, G. M.; BRUM, D. S.; HILGERT, T. F.; BERNARDI, M. L.; SILVA, C. A. M.; RUBIN, M. I. B. Desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos mantidos em fluido folicular bovino de folículos de diferentes diâmetros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 40, p. 169-177, 2003.

ROMERO-ARREDONDO, A.; SEIDEL JR, G.E. Effects of bovine follicular fluid on maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**. v. 41, p. 383-394, 1994.

SASSEVILLE, M.; ALBUZ, F. K.; CÔTÉ, N.; GUILLEMETTE, C.; GILCHRIST, R. B.; RICHARD, F. J. Characterization of novel phosphodiesterases in the bovine ovarian follicle. **Biology of Reproduction**. v. 81, p. 415-425, 2009.

SILVA, L. K. X.; REIS, A. N.; SILVA, A. O. A.; SOUSA, J. S.; VALE, W. G. Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação por diferentes períodos de tempo sem controle da atmosfera gasosa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 63, n. 1, p. 74-80, 2011.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**. v. 49, p. 483-497, 1998.

THOMAS, R. E.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B. Differential effects of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on bovine oocyte meiotic maturation. **Developmental Biology**. v. 244, p. 215-225, 2002.

ULLOA, S. M. B.; HEINZMANN, J.; HERRMANN, D.; TIMMERMANN, B.; BAULAIN, U.; GROBFELD, R.; DIEDERICH, M.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Effects of different oocyte retrieval and *in vitro* maturation systems on bovine embryo development and quality. **Zygote**. p. 1-11, 2014.

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

VARISANGA, M. D.; DONG, Y. J.; MTANGO, N. R.; SUZUKI, T. Comparison of the effects of using standard and simple portable CO<sub>2</sub> incubators on the *in vitro* developmental competence of bovine embryos reconstituted by somatic cell nuclear transfer. **Theriogenology**. v. 58, p. 77-86, 2002.

WATSON, A. J.; SOUSA, P.; CAVENEY, A.; BARCROFT, L. C.; NATALE, D.; URQUHART, J.; WESTHUSIN, M. E. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. **Biology of Reproduction**. v. 62, p. 355-364, 2000.

## **CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os tratamentos propostos nesse estudo para a inibição da meiose utilizando butirolactona-I, IBMX associado a forskolina seguido da maturação com cilostamida e em fluido folicular puro, com exceção da milrinona durante o transporte de oócitos bovinos por 6h demonstrou efeitos benéficos na maturação oocitária e na produção e qualidade embrionária quando comparados com o transporte em meio de maturação.

Para uma aplicação em rotina de reprodução animal assistida o tratamento com fluido folicular puro não é indicado visto que há muita variabilidade nos resultados. Os melhores tratamentos a serem empregados seriam com butirolactona-I ou IBMX associado a forskolina seguido da maturação com cilostamida. Porém a butirolactona-I tem maior custo-benefício por se tratar de uma única droga.