

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AÇÃO DO FORSKOLIN EM DIFERENTES FASES DA PRODUÇÃO *IN VITRO*:
IMPLICAÇÃO NA MEIOSE OOCITÁRIA E NA VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES
BOVINOS

DANIELA MARTINS PASCHOAL

Botucatu – SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AÇÃO DO FORSKOLIN EM DIFERENTES FASES DA PRODUÇÃO *IN VITRO*:
IMPLICAÇÃO NA MEIOSE OOCITÁRIA E NA VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES
BOVINOS

DANIELA MARTINS PASCHOAL

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Doutor.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fernanda da
Cruz Landim

Nome da autora: Daniela Martins Paschoal

Titulo: AÇÃO DO FORSKOLIN EM DIFERENTES FASES DA PRODUÇÃO *IN VITRO*: IMPLICAÇÃO NA MEIOSE OOCITÁRIA E NA VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Fernanda da Cruz Landim
Presidente e Orientadora
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a. Eunice Oba
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a. Maria Denise Lopes
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a. Claudia Barbosa Fernandes
Membro
Departamento de Reprodução Animal
FMVZ – USP – São Paulo

Prof^a. Dr^a. Gisele Zoccal Mingoti
Membro
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal
FMVA – UNESP – Araçatuba

Data da defesa: 09 de Agosto de 2013.

*Dedico essa Tese e todo meu trabalho,
exclusivamente ao meu grande herói,
meu pai (in memoriam).*

Agradecimentos

A Deus...

... Que me ensinou da forma mais triste, que a maneira mais simples que temos de conseguir nossos objetivos e sonhos, é somente confiando Nele... Que me mostrou que, mesmo com todos os problemas que possuímos sempre existe alguém mais fraco que nós, por isso é nossa obrigação lutar... Agradeço à Deus por ter me reerguido a cada desespero que passei nos últimos anos, por ter me carregado em Seus braços toda vez que O chamei e principalmente por ter me fortalecido para compor essa Tese.

À minha querida orientadora Prof^a. Dr^a. Fernanda da Cruz Landim pela orientação suprema, amizade e principalmente pela compreensão dos meus problemas.

Aos meus amados pais, Aparecida e Reinaldo (*in memoriam*), e amada irmã, Flavia pelo apoio, conforto e paciência, sem os quais eu jamais saberia o valor de uma família.

Ao meu grande amor Pituta, pelo seu carinho, amizade, presença e alegria.

À minha cachorra Sissi (*in memoriam*), por ter sido minha companheira fiel por quase 14 anos e por ter ficado ao meu lado nos meus momentos de tristeza.

À Vida que me proporciona muita alegria e satisfação e à Vivi por estar participando de mais uma etapa importante da minha vida.

À minha vó Elisa e ao meu vô José, por me acompanharem, me amarem e por entenderem minha ausência.

À minha família de Descalvado: tia Uça, tio Paulo, tia Jôse, tio Panone, tia Bete e a todos meus primos e primas que sempre torceram por mim.

Aos meus sogros, Isabel e José Carlos, por me amarem como uma filha e ao seu cachorrinho Nick o qual está em minha vida por muitos anos.

Ao meu tio Prof. Dr. Alicio, o meu exemplo profissional, pelo auxílio, sabedoria e presença em minha vida. À minha tia Silvia, sua esposa, pelo seu carinho e incentivo.

À minhas amigas Nara, Soliane e Beth, pelo carinho e atenção.

Aos meus tios Dalva, Nancy (*in memoriam*) e Vado por sempre me acolherem como uma filha, pelo aconchego familiar e principalmente pelo incentivo de continuar estudando. À Pink, que sem querer, apareceu em minha vida para me alegrar.

Ao meu tio Sergio pela distração e pela companhia de sempre em meus experimentos noturnos.

Aos meus tios Fada e Bob pelo carinho e presença em minha vida.

Aos meus primos Tato e Ágda, André e Amanda e Rico pela amizade e companheirismo de sempre e aos seus respectivos bichinhos que sempre estiveram presentes: Peter, Fred, Dáfne e Mel.

Ao meu tio Gildo (*in memoriam*) por suas constantes orações.

Aos meus primos Myrtha, Ildo, Angelo e tia Jone pelos divertidos momentos que passamos.

Aos meus amigos Rosiara, Midyan e Mateus, por sempre estarem ao meu lado me ajudando, tanto na vida profissional, quanto na pessoal.

Aos amigos de trabalho: Letícia, Bianca, João, Tati, Luís Vergara, Luís Magalhães, Michelle Araujo, Henrique, Maria Clara, Patrícia Pôrto e a todos os residentes que conheci.

Aos professores do departamento: Papa, Marco, Denise, Nereu, Sony, Eunice, João e Meira pelos seus ensinamentos.

Aos funcionários do departamento, Cristina, Walter, Edilson, Raquel por todos os auxílios que me prestaram quando precisei.

À Claudete, ao Thiago, à Maria Helena e à Shelly, os quais me ajudaram com a microscopia eletrônica de transmissão e com o microscópio confocal.

Ao frigorífico Frigol de Lençóis Paulista/SP e ao Plínio pelo fornecimento e ajuda com a colheita com os ovários.

A todos os animais do frigorífico que contribuíram para a realização do meu experimento.

A todas as pessoas, que contribuíram de alguma forma nesse trabalho e sempre estiveram torcendo por mim.

À FAPESP, pelo apoio financeiro, sem o qual a realização de todo esse experimento não seria possível (Processo n. 2010/50410-2).

LISTA DE TABELAS

TRABALHO 1

Tabela 1-	Avaliação da maturação nuclear com Hoechst 33342 de oócitos maturados por 6 horas com diferentes concentrações de forskolin. Total de 8 réplicas com 298 oócitos (média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão).....	67
Tabela 2-	Avaliação da maturação nuclear com Hoechst 33342 de oócitos maturados por 6 horas com diferentes concentrações de forskolin, seguido da maturação livre do agente por 18 horas. Total de 8 réplicas com 336 oócitos (média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão).....	67
Tabela 3-	Avaliação da maturação citoplasmática a partir da intensidade de fluorescência e da distribuição das mitocôndrias com MitoTracker® Orange CMTMRos de oócitos maturados por 6 horas com diferentes concentrações de forskolin, seguido da maturação livre do agente por 18 horas. Total de 8 réplicas com 10 oócitos por grupo (média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão).....	68
Tabela 4-	Taxa de formação de blastocistos avaliados no D 7 a partir oócitos maturados por 6 horas com diferentes concentrações de forskolin, seguido da maturação livre do agente por 18 horas. Total de 8 réplicas (média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão).....	68
Tabela 5-	Avaliação do número total de células e do índice de apoptose de blastocistos no D 7, a partir de oócitos maturados por 6 horas com diferentes concentrações de forskolin, seguido da maturação livre do agente por 18 horas. Total de 8 réplicas com 10 a 15 embriões por grupo (média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão).....	69

TRABALHO 2

Tabela 1-	Produção de blastocistos avaliados no dia 7 com diferentes concentrações de forskolin adicionadas no dia 6 do cultivo. Total de 8 réplicas e 577 blastocistos (média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão).....	105
Tabela 2-	Conteúdo lipídico embrionário avaliado no dia 7 com diferentes concentrações de forskolin adicionadas no dia 6 do cultivo. Total de 8 réplicas e n = 10 por grupo (média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão).....	105
Tabela 3-	Taxa de reexpansão dos embriões que foram aquecidos (após vitrificação no dia 7), com diferentes concentrações de forskolin adicionadas no dia 6 do cultivo. Total de 8 réplicas e n = 259 (média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão).....	106
Tabela 4-	Avaliação do número total de células íntegras e da taxa de apoptose de blastocistos frescos (dia 7) e aquecidos (pós vitrificação) com diferentes concentrações de forskolin adicionadas no dia 6 do cultivo. Total de 8 réplicas e n = 10 a 15 por grupo de embriões frescos e aquecidos (média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão).....	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Esquema ilustrando os eventos do bloqueio e reinício da meiose oocitária. A: evento ocorrido durante o bloqueio da meiose, com o núcleo em estágio de vesícula germinativa (VG). Nesse caso o forskolin atua elevando os níveis de adenosina monofosfato cíclica (cAMP). B: evento normal da meiose oocitária, onde há uma diminuição nos níveis de cAMP, ativação do fator promotor de maturação (FPM), quebra da vesícula germinativa (QVG) e maturação oocitária.....	11
Figura 2-	Esquema da distribuição das organelas citoplasmáticas durante a maturação, fertilização e formação do zigoto bovino. A: progressão da maturação nuclear e movimentação das organelas citoplasmáticas, desde o estágio de vesícula germinativa (VG) até a metáfase II (M II) e estágio de formação do embrião. B: distribuição das organelas, disposição dos grânulos corticais (GC) e fecundação do espermatozóide.....	17
Figura 3-	Dinâmica dos filamentos do citoesqueleto durante a maturação citoplasmática e nuclear de oócitos bovinos. A: detalhe do fuso meiótico em metáfase I (M I) e a estrutura do centríolo / centrossomo. B: detalhe do fuso meiótico em telófase I, em que podemos ver os microtúbulos entre os conjuntos cromossômicos.....	24
Figura 4-	Esquema da ação do forskolin como agente lipolítico no embrião: ativação da adenilato ciclase, da adenosina monofosfato cíclica (cAMP) e liberação do glicerol.....	28

TRABALHO 1

Figura 1-	Apresentação fotográfica da avaliação dos estágios nucleares dos oócitos dos grupos experimentais em microscópio invertido com luz fluorescente ultra-violeta. Após a coloração com Hoechst 33342 os oócitos foram classificados em: Vesícula Germinativa (VG); Quebra da Vesícula Germinativa (QVG); Metáfase I (M I); Metáfase II (M II) e Degenerado ou Não Identificado (D/NI). Aumento de 400 x.....	70
Figura 2-	Imagem ilustrativa da técnica de coloração dos oócitos com MitoTracker Orange CMTMRos, avaliados em microscópio invertido a Laser Confocal. A: Oócito em M II corado com Hoechst 33342. B: Overlay do oócito corado com MitoTracker Orange CMTMRos. C: Vários cortes de um único oócito, realizados pelo microscópio Confocal – esses cortes referem-se ao oócito em destaque (B) (Barras: A: 28,5 µm; B: 30,1 µm; C: 30,4 µm).....	71
Figura 3-	Avaliação em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de oócitos do grupo Imaturo (0 hora). A: células da granulosa (CG) bem compactas. B: presença de cluster de grânulos corticais (GC), mitocôndrias (Mt) e grânulos lipídicos (GL). C: espaço perivitelínico (EP) bem dilatado. D: presença de microvilosidades (Mv) e junções das células da granulosa do tipo junção intermediária (JI) e retículo endoplasmático liso (REL). Cit: citoplasma. ZP: zona pelúcida.....	72

- Figura 4- Avaliação em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de oócitos do grupo Controle. A: característica normal das células da granulosa (CG) após 24 horas de maturação, com aspecto expandido. B: citoplasma contendo associações de mitocôndrias (Mt) e grânulos lipídicos (GL). Observar que os clusters de grânulos corticais (GC) se desfizeram e se direcionaram para a periferia do ooplasma. C: resolução maior do ooplasma demonstrando a associação existente entre mitocôndrias (Mt) e retículo endoplasmático liso (REL), as junções intermediárias (JI) e os grânulos corticais (GC) periféricos. D: presença de grânulos lipídicos (GL) já em processo de metabolização pelas mitocôndrias (Mt). Cit: citoplasma. ZP: zona pelúcida..... 73
- Figura 5- Avaliação em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de oócitos dos grupos somente bloqueados (A e B) e bloqueados e revertidos (C e D). A: Oócitos do grupo F 0,05 mM que foram bloqueados por 6 horas – apresentaram uma melhor preservação do citoplasma. B: Oócitos do grupo F 0,1 mM que foram bloqueados por 6 horas – apresentaram uma alta metabolização dos grânulos lipídicos (GL), demonstrado pela grande desorganização do citoplasma (Cit) e pela presença de figuras mielínicas (Mi). C: Oócitos do grupo F 0,05 mM que foram bloqueados por 6 horas e revertidos por 18 horas – também demonstraram uma melhor preservação de suas estruturas. D: Oócitos do grupo F 0,1 mM que foram bloqueados por 6 horas e revertidos por 18 horas – apresentou uma desorganização das estruturas citoplasmáticas. Mt: mitocôndrias. EP: espaço perivitelínico. JI: junção intermediária. REL: retículo endoplasmático liso. ZP: zona pelúcida..... 74
- Figura 6- Avaliação em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de blastocistos PIV (D7) a partir de oócitos bloqueados por 6 horas com diferentes concentrações de forskolin na maturação e revertidos por 18 horas em meio livre de forskolin. Blastocistos do grupo Controle – A: presença de mitocôndrias (Mt), grânulos lipídicos (GL) e retículo endoplasmático liso (REL) associados. Observar a alta metabolização dos grânulos lipídicos (GL) e A': presença de vários complexos de Golgi (cG) e retículo endoplasmático liso (REL) pelo citoplasma. Blastocistos do grupo F 0,025 mM – B: observação de um citoplasma (Cit) evidente com as mitocôndrias (Mt) complexos de Golgi (cG), grânulos lipídicos (GL) e núcleo celular (N) e B': observação do núcleo celular (N), da zona pelúcida (ZP) bem dilatada e ausência de espaço perivitelínico (EP) e microvilosidades (Mv). Blastocistos do grupo F 0,05 mM – C: presença de mitocôndrias (Mt) com cristas incompletas e grânulos lipídicos (GL) em menores quantidades. Foi observada a presença de junções entre os blastômeros do tipo junções tight (coating) (JT) e C': presença de muitas microvilosidades (Mv) e complexo de Golgi (cG). Blastocistos do grupo F 0,1 mM – D: visualização das mitocôndrias (Mt) e grânulos lipídicos (GL) e D': além dos complexos de Golgi (cG), entre as células foi encontrada a junção densa (coating) (JD). BL: blastocle..... 75

- Figura 7- Embriões bovinos dos diferentes grupos submetidos à técnica TUNEL avaliados em microscópio de fluorescência invertido. CN: controle negativo da técnica; CP: controle positivo da técnica. A e A': grupo Controle; B e B': grupo: F 0,025 mM; C e C': grupo: F 0,05 mM; D e D': grupo: F 0,1 mM. Coloração azul (Hoescht) representa o número total de células íntegras. Coloração verde (FITC) indica o DNA fragmentado de células apoptóticas. Aumento de 400 x. Barra: 100 μ m..... 77

TRABALHO 2

- Figura 1- Representação dos processos de vitrificação. A: bancada contendo os equipamentos necessários: placa aquecedora com temperatura de 38°C, palhetas de 0,25 mL, lacres para palhetas, pipetadores com volume flexível, caixas de ponteiras, cronômetro, caneta permanente e seringas de 1 mL. B: estereomicroscópio. C: representação do encaixe da palheta de 0,25 mL na seringa de 1mL para proceder a vitrificação. D: caixa de isopor com nitrogênio líquido a -196°C com um globete de plástico em seu vapor na espera da transferência da palheta. E: caixa de isopor com nitrogênio líquido a -196°C contendo a palheta dentro do globete de plástico. F: palheta francesa de 0,25 mL após sua retirada do N₂ líquido – flecha indica lugar de permanência do embrião mais o MV2. G: demonstração de embriões PIV frescos antes da vitrificação. H e I: demonstração de embriões PIV após serem vitrificados e aquecidos. 107
- Figura 2- Embriões bovinos submetidos à técnica do corante lipofílico Sudan Black B. Pontos com coloração negra são referentes às gotas lipídicas citoplasmáticas. A: Grupo Controle; B: Grupo: F 2,5 μ M; C: Grupo: F 5 μ M; D: Grupo: F 10 μ M. Aumento de x 400. Barra: 100 μ m..... 108
- Figura 3- Embriões bovinos dos diferentes grupos submetidos à técnica TUNEL avaliados em microscópio invertido de fluorescência. CN: controle negativo da técnica; CP: controle positivo da técnica. A e A': grupo Controle; B e B': grupo F 2,5 μ M; C e C': grupo F 5 μ M; D e D': grupo F 10 μ M. Coloração azul (Hoescht) representa o número total de células íntegras. Coloração verde (FITC) indica o DNA fragmentado de células apoptóticas. Aumento de x 400. Barra: 100 μ m..... 109
- Figura 4- Embriões bovinos PIV dos diferentes grupos, após serem vitrificados e aquecidos, submetidos à técnica TUNEL avaliados em microscópio de fluorescência. A e A': grupo Controle; B e B': grupo F 2,5 μ M; C e C': grupo F 5 μ M; D e D': grupo F 10 μ M. Coloração azul (Hoescht) representa o número total de células íntegras. Coloração verde (FITC) indica o DNA fragmentado de células apoptóticas. Aumento de x 400. Barra: 100 μ m..... 111

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

µg: micrograma
µL: microlitro
µM: micromolar
µm: micrômetro
1º CP: primeiro corpúsculo polar
2º CP: segundo corpúsculo polar
ADP: adenosina difosfato
ATP: adenosina trifosfato
Be: blastocisto eclodido
Bi: blastocisto inicial
BL: blastocele
Bl: blastocisto
Bn: blastocisto em eclosão
BSA: albumina sérica bovina
Bx: blastocisto expandido
Ca²⁺: cálcio
cAMP: adenosina monofosfato cíclica
CCOs: complexos *cumulus oophorus*
CG: células da granulosa
cG: complexos de Golgi
Cit: citoplasma
CIV: cultivo *in vitro*
cm: centímetro
CN: controle negativo
CO₂: gás carbônico
CP: controle positivo
D 6: sexto dia
D 7: sétimo dia
D/NI: degenerado ou não identificado
dbcAMP: dibutilil cAMP
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA: ácido desoxirribonucleico
DNAmt: DNA mitocondrial

EG: etileno glicol
EP: espaço perivitelínico
F: Forskolin
FIV: fertilização *in vitro*
FPM: fator promotor da maturação
FSH: hormônio folículo estimulante
g: grama
GC: grânulos corticais
GL: grânulos lipídicos
GMP: glass micropipette (micropipeta de vidro)
HTF: Human Tubal Fluid
IBMX: isobutilmetilxantina
JD: junção densa
JI: junções intermediárias
LH: hormônio luteinizante
M I: Metáfase I
M II: Metáfase II
M: molar
MB: Meio Base
MCI: massa celular interna
MCP: morte celular programada
MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão
mg: miligrama
MIV: maturação *in vitro*
mL: mililitro
mM: milimolar
mm: milímetro
mRNA: RNA Mensageiro
Mt: mitocôndria
Mv: microvilosidades
MV1: Meio de Vitrificação 1
MV2: Meio de Vitrificação 2
N: núcleo
N₂: nitrogênio

NaCl: cloreto de sódio

nM: nanomolar

O₂⁻: ânion superóxido

OH⁻: radical hidroxila

OPS: open pulled straw

OPU: ovum pick-up

OXPHOS: fosforilação oxidativa

p/v: peso por volume

PBS: phosphate buffered saline

PDE: fosfodiesterase

PES: etosulfato de fenazina

PIV: produção *in vitro*

PKA: proteína quinase

PVA: álcool polivinil

PVP: polivinilpirrolidona

QVG: quebra da vesícula germinativa

RE: retículo endoplasmático

REL: retículo endoplasmático liso

RNA: ácido ribonucleico

ROS: espécies reativas de oxigênio

rRNA: RNA Ribossomal

SFB: soro fetal bovino

SOFaa: Synthetic Oviductal Fluid mais aminoácidos

TCA: tricarboxílico

TCM 199: Tissue Culture Medium

TE: transferência de embriões

TUNEL: Terminal deoxinucleotil transferase Uracil Nick End Labeling

UI: Unidades Internacionais

v/v: volume por volume

VG: vesícula germinativa

ZP: zona pelúcida

α: alfa

β: beta

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 –.....	1
INTRODUÇÃO.....	2
REVISÃO DE LITERATURA.....	6
1 Maturação Nuclear.....	6
2 Maturação Citoplasmática.....	11
2.1 Redistribuição das organelas citoplasmáticas.....	12
2.1.1 Ribossomos.....	13
2.1.2 Retículo Endoplasmático (RE).....	13
2.1.3 Complexo de Golgi (cG).....	14
2.1.4 Grânulos corticais (GC).....	14
2.1.5 Mitocôndrias.....	15
2.2 Modificações ultraestruturais nas mitocôndrias conforme sua reorganização no desenvolvimento celular.....	17
2.3 Sondas Fluorescentes Marcadoras de Mitocôndrias.....	20
2.4 Maturação Molecular.....	21
2.5 Dinâmica dos Filamentos do Citoesqueleto.....	23
3 Visão Atual de Embriões Bovinos Produzidos <i>in vitro</i> (PIV) no Brasil.....	25
4 Produção <i>in vitro</i> (PIV) de Embriões Bovinos e o Reflexo da Presença do Soro Fetal Bovino (SFB).....	26
5 Vitrificação de Embriões Bovinos Produzidos <i>in vitro</i> (PIV).....	29
5.1 Características e Composição dos Meios de Vitrificação.....	31
6 Apoptose Celular.....	34
CAPÍTULO 2 – Trabalho Científico 1.....	38
Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos após o bloqueio da maturação oocitária com diferentes concentrações de forskolin.....	39
CAPÍTULO 3 – Trabalho Científico 2.....	79
Vitrificação de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> após lipólise química com forskolin.....	80
CAPÍTULO 4 –	112
CONCLUSÕES GERAIS.....	113
BIBLIOGRAFIA.....	114
Anexos.....	131

*“Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha
fortaleza, e Nele confiarei...
Porque aos seus anjos dará ordem a teu
respeito, para te guardarem em todos os
teus caminhos...”
(Salmo 91:1,11)*

PASCHOAL, D.M. **Ação do forskolin em diferentes fases da produção *in vitro*: implicação na meiose oocitária e na vitrificação de embriões bovinos.** Botucatu, 2013. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O forskolin eleva as concentrações de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) por meio da ativação da adenilato ciclase. Esse experimento possuiu o objetivo de utilizar o forskolin para melhorar a produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos. No Experimento I o forskolin foi adicionado no meio de maturação *in vitro* (MIV) com o objetivo de bloquear a meiose nuclear induzindo sua sincronização com a maturação citoplasmática. O Experimento II possuiu o objetivo de induzir uma lipólise química em embriões do D 6 a partir da utilização do forskolin, diminuindo sua sensibilidade após a vitrificação. No Experimento I, os oócitos permaneceram em meio MIV durante 6 horas na presença de três concentrações de forskolin: 0,025 mM; 0,05 mM; 0,1 mM e em seguida foram cultivados em meio MIV livre de forskolin por 18 horas. Após esse tempo os oócitos foram fertilizados e cultivados *in vitro*. Foi avaliado o estágio de maturação nuclear, a atividade e distribuição mitocondrial, a ultraestrutura oocitária, contagem do número de células e a apoptose celular. O tratamento com forskolin por 6 horas não resultou em atraso na quebra da vesícula germinativa em relação ao controle. Entretanto, após a retirada do bloqueio e maturação por 18 horas um maior número de oócitos tratados com 0,1 mM de forskolin se encontrou em MI ($P<0,05$). Não houve diferença com relação a atividade e distribuição mitocondrial nos oócitos, no entanto a maior concentração da droga levou a alterações ultraestruturais nos oócitos, com excesso de metabolização lipídica e desorganização do citoesqueleto. Apesar disso, não se observou diferença na taxa de produção de blastocistos avaliados no D 7, bem como no número total de células íntegras dos embriões. Entretanto, observou-se uma maior taxa de apoptose no grupo de blastocistos produzidos a partir de oócitos bloqueados com a maior concentração de forskolin ($P<0,05$). Conclui-se que o forskolin, utilizado isoladamente, não foi eficiente em bloquear a M II. A maior concentração do agente causou um alto índice de apoptose celular, sendo confirmado pela análise ultraestrutural, entretanto sem prejudicar a PIV de embriões. No Experimento II, os

zigotos foram cultivados em meio SOFaa até o D 6, momento que foi adicionado o forskolin nas concentrações: 2,5 μ M; 5 μ M; 10 μ M, permanecendo por 24 horas. Em seguida foi realizada a vitrificação, contagem do número de células, avaliação do índice de apoptose e quantificação dos grânulos de lipídios. Não foi observada diferença na taxa de formação de blastocisto e nem na taxa de reexpansão após a vitrificação e aquecimento. Por outro lado, após a quantificação lipídica, todos os grupos foram significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$), e tanto o número total de células íntegras quanto a taxa de apoptose dos embriões frescos foram significativamente superiores aos embriões vitrificados ($P < 0,05$). Concluiu-se que o forskolin é um agente lipolítico eficiente mesmo em baixas concentrações (grupo F 2,5 μ M), levando a formação de blastocistos com um maior número de células quando comparado ao grupo controle. Após a vitrificação observou-se um efeito benéfico da lipólise química na reexpansão dos embriões e na redução da taxa de apoptose celular.

Palavras-chave: Apoptose, Criopreservação, Lipídio, Maturação.

PASCHOAL, D.M. **Forskolin action at different stages of *in vitro* production: implication in oocyte meiosis and in bovine embryos vitrification.** Botucatu, 2013. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The forskolin raises concentrations of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) through the activation of adenylate cyclase. This experiment aimed the use of forskolin to enhance *in vitro* production (IVP) of bovine embryos. In Experiment I, forskolin was added in the medium of *in vitro* maturation (IVM) with the objective of blocking nuclear meiosis inducing your synchronization with cytoplasmic maturation. Experiment II aimed to induce lipolysis chemical in D 6 embryos from the use of forskolin, decreasing its sensitivity after vitrification. In the first experiment, the oocytes remained in IVM medium for 6 hours in the presence of three concentrations of forskolin: 0.025 mM, 0.05 mM, 0.1 mM and then were cultured in medium free forskolin for 18 hours. After this time the oocytes were *in vitro* fertilized and cultured. We assessed the stage of nuclear maturation, activity and distribution mitochondrial, ultrastructure oocyte, total number of cells and apoptosis. The treatment with forskolin for 6 hours did not resulted in delay in VCBF in relation to control group. However, after the removal of the drug and maturation for 18 hours a higher number of oocytes treated with 0.1 mM of forskolin were still in MI ($P<0.05$). No differences in relation to mitochondrial activity and distribution were observed between groups. However the higher concentration of the drug induced ultrastructural damage to oocytes, with excess of lipid metabolization and cytoskeleton disorganization. Nevertheless, no statistical differences were observed on blastocyst production and on the number of total cells. Despite of that, a higher rate of apoptosis was observed on the group treated with the highest concentration of forskolin ($P<0.05$). We conclude that the forskolin, when used alone, was not efficient to block the meiosis in bovine oocytes. Although embryo production rate was similar among groups, the concentration of 0.1mM significantly increased the apoptosis rate on the produced embryos confirming the alteration founded in the ultrastructural analysis of the oocytes. In Experiment II, the zygotes were cultured in SOFaa until the D 6, the time that forskolin was added at concentrations of 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, remaining for 24 hours. Then were performed vitrification, total number of

cells evaluation, apoptosis index evaluation and quantification of lipid granules. There was no difference in the rate of blastocyst formation nor in the rate of re-expansion after vitrification and warming. In the other hand, after the measurement lipid, all groups were significantly different ($P<0.05$) and both the total number of viable cells and apoptosis rate of the fresh embryos were significantly superior to embryos vitrified ($P<0.05$).). It was concluded that forskolin is an effective lipolytic agent even at low concentrations ($2.5 \mu\text{M}$), leading to formation of blastocysts with a higher number of cells compared to the control group. After vitrification there was a beneficial effect of the drug on embryo reexpansion and reduction of apoptosis.

Key-words: Apoptosis, Cryopreservation, Lipid, Maturation.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento das técnicas de reprodução assistida em animais, ocorreu um grande avanço sobre a melhora e multiplicação de fêmeas de interesse não só para a produção animal, mas também para a conservação e regeneração de espécies animais em perigo de extinção. A maturação e a fertilização *in vitro* (MIV e FIV, respectivamente) dos oócitos e o cultivo *in vitro* (CIV) dos zigotos tem produzido, em média, 36 crias por ano de uma única fêmea (RUMPF, 2007), por isso vem sendo muito utilizado em laboratórios e a campo. Neste contexto, os estudos e pesquisas sobre as biotecnologias capazes de aperfeiçoar essa produção estão em ascensão cada vez mais.

Devido a sua grande capacidade de produção de descendentes, uma vez atendida a demanda interna, a produção *in vitro* (PIV) deverá voltar-se ainda mais para o mercado externo, particularmente pela posição do país como referência em genética bovina adaptada aos trópicos, o que exigirá um grande esforço da pesquisa para superar algumas limitações ainda inerentes à técnica, principalmente na questão da criopreservação dos embriões (VIANA e CAMARGO, 2007). Apesar desses avanços obtidos, a PIV de embriões ainda apresenta algumas limitações, que ainda precisam ser superadas, tais como os baixos índices de blastocisto, dificuldades na criopreservação dos embriões, além dos componentes dos meios de cultivo que muitas vezes prejudicam o desenvolvimento embrionário.

A partir disso, algumas alterações têm sido feitas com oócitos e com embriões, a fim de produzir um embrião de melhor qualidade apto para inovulação ou para criopreservação.

Em relação aos oócitos se tem recomendado a inibição ou o atraso da maturação nuclear, que permite mais tempo para o oócito acumular as moléculas importantes para o desenvolvimento embrionário (BILODEAU-GOESEELS, 2012). Isso é sugerido porque, como nos processos *in vitro* os oócitos retomam a meiose imediatamente após suas retiradas do folículo, a maioria dos oócitos que atingem o estágio de meiose II não sofre adequadamente o processo de capacitação oocitária, não possuindo a mesma competência para o desenvolvimento embrionário em comparação aos oócitos maturados *in vivo* (AVERY et al., 2002). Isto porque a aceleração da maturação nuclear *in vitro* faz com que a maturação citoplasmática aconteça de forma assincrônica em relação a nuclear.

O cultivo de oócitos com o forskolin durante a MIV, por um determinado período, impede o recomeço da meiose, principalmente por esse agente elevar os níveis de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) intra-oocitário e os oócitos retornam a meiose logo após a retirada do forskolin do meio. A cAMP, derivada das células do *cumulus*, é transferida através dos prolongamentos intracelulares que penetram a zona pelúcida até o ooplasma e consiste em uma molécula reguladora da maturação nuclear (BILODEAU et al., 1993; RACOWSKY, 1984; SIRARD e FIRST, 1988; SIRARD, 1990).

A maturação, portanto consiste no estágio mais importante da PIV de embriões, pois além de sofrer modificações nucleares para desenvolver a capacidade de fertilização, os oócitos estocam substâncias e passam por alterações morfológicas (maturação citoplasmática), que promovem e são essenciais para o início do desenvolvimento embrionário (MARQUES et al., 2007).

Com relação aos baixos índices de embriões PIV, pode-se dizer que um dos fatores agravantes seria o soro fetal bovino (SFB) presente em quase todos os meios de CIV e é bem provável que esse SFB aumente o lipídio citoplasmático, influenciando na qualidade dos embriões e reduzindo sua sobrevivência após a criopreservação. Como é quase impossível de produzir embrião na ausência total dessa proteína, uma alternativa seria modificar as condições de cultivo. Nessas condições, a adição do forskolin no meio de cultivo pode causar uma lipólise química com os embriões PIV, melhorando sua qualidade e sua criotolerância em processos de vitrificação (MEN et al., 2006; PASCHOAL et al., 2012). Esse agente lipolítico induz potencialmente a ativação da adenilato ciclase a qual ativa uma lipase endógena através da cAMP e da proteína quinase, liberando glicerol (CUELLO et al., 2013).

Assim, como a necessidade de uma metodologia adequada, para a estocagem de embriões em nitrogênio líquido sem afetar sua qualidade, se intensificada com o passar dos anos, atualmente a expectativa se volta para a criopreservação com a transferência direta, e estas técnicas continuam sendo um desafio para a pesquisa, sendo que os melhores resultados estão relacionados com a vitrificação.

OBJETIVOS GERAIS

Esse experimento possuiu como objetivo principal a utilização do forskolin para melhorar a produção *in vitro* de embriões bovinos. Para isso foi dividido em duas etapas: Experimento I e Experimento II.

Experimento I:

Adicionar o forskolin no meio de maturação *in vitro* com o objetivo de bloquear a meiose oocitária, permitindo mais tempo para o oócito acumular as moléculas importantes para o desenvolvimento embrionário. Esse bloqueio sincronizará a maturação nuclear com a citoplasmática, tornando os oócitos aptos à fecundação e ao desenvolvimento embrionário.

Experimento II:

Possui o objetivo de induzir uma lipólise química em embriões adicionando o forskolin no sexto dia de cultivo *in vitro*, melhorando sua sensibilidade a vitrificação.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Experimento I:

1- Avaliar a resposta dos oócitos que foram maturados por 6 horas com diferentes concentrações de forskolin na MIV (0,1 mM; 0,05 mM; 0,025 mM) a partir do estágio de desenvolvimento meiótico do núcleo.

2- Avaliar a resposta dos oócitos que foram maturados durante 6 horas com diferentes concentrações de forskolin na MIV (0,1 mM; 0,05 mM; 0,025 mM) seguidos da maturação por 18 horas livre desse agente, com o objetivo de induzir um bloqueio meiótico seguido da retomada da meiose.

3- Avaliar a maturação citoplasmática a partir da sonda fluorescente MitoTracker Orange CMTMRos de oócitos que foram maturados durante 6 horas com diferentes concentrações de forskolin na MIV (0,1 mM; 0,05 mM; 0,025 mM) seguidos da maturação por 18 horas livre desse agente.

4- Avaliar a taxa de formação de embriões PIV no D 7, a partir de oócitos que foram maturados durante 6 horas com diferentes concentrações de forskolin na MIV (0,1 mM; 0,05 mM; 0,025 mM) seguidos da maturação por 18 horas livre desse agente.

5- Avaliar a ultraestrutura da organização e localização das organelas presentes em oócitos e embriões, a partir da microscopia eletrônica de transmissão, bem como o número total de células íntegras e a ocorrência de apoptose através da técnica TUNEL nos embriões oriundos dos diferentes grupos experimentais.

Experimento II:

1- Avaliar a taxa de formação de blastocistos PIV no D 7 com as diferentes concentrações do forskolin (2,5 μ M; 5 μ M; 10 μ M) adicionadas no D 6 do cultivo.

2- Avaliar se o forskolin foi capaz de induzir lipólise química em suas diferentes concentrações (2,5 μ M; 5 μ M; 10 μ M) quando adicionado no D 6 do cultivo, a partir do corante Sudan Black B.

3- Avaliar a taxa de sobrevivência dos blastocistos PIV após a vitrificação e aquecimento por meio da taxa de reexpansão dos diferentes grupos experimentais.

4- Avaliar o número total de células íntegras e a ocorrência de apoptose por meio da técnica TUNEL com os embriões frescos e aquecidos oriundos dos diferentes grupos experimentais.

HIPÓTESES

Experimento I:

A hipótese levantada é que a adição de forskolin durante a MIV nuclear sincronizará a maturação nuclear com a citoplasmática, as quais são dependentes, mas assíncronas. Desta forma tornará os oócitos aptos à fecundação e ao cultivo *in vitro* embrionário e aumentará a taxa de blastocistos no D 7 com um índice de apoptose reduzido.

Experimento II:

A adição do forskolin durante o cultivo influenciará positivamente na PIV de embriões bovinos oriundos de meios quimicamente indefinidos, por meio da lipólise química que aumentará a resistência dos blastocistos aos processos de vitrificação, por meio da diminuição da apoptose.

REVISÃO DE LITERATURA

1 Maturação Nuclear

Durante a oogênese, os oócitos de mamíferos permanecem retidos no estágio de diplóteno da prófase da primeira divisão meiótica, desde a vida fetal até pouco antes da ovulação. O reinício da meiose ou saída do estágio de diplóteno *in vivo* pode ser mediada por um estímulo hormonal ou simplesmente pela retirada do oócito de dentro do folículo (BILODEAU-GOESEEL, 2006). Como nos processos *in vitro* os oócitos retomam à meiose imediatamente após sua retirada dos folículos, muitos oócitos em metáfase II (M II) não sofrem adequadamente o processo de capacitação, desta forma não têm a mesma competência para se desenvolver em comparação aos oócitos maturados *in vivo* (AVERY et al., 2002).

A maturação nuclear ou meiótica corresponde à divisão reducional dos cromossomos, que tem como objetivo central a produção dos gametas haploides, aptos para fecundação e posterior desenvolvimento embrionário. Este processo se inicia ainda

na vida uterina, sendo que a maioria dos mamíferos já nasce com uma reserva de oócitos bloqueados no estágio de vesícula germinativa (VG) (HAFEZ, 1995; VORONINA e WESSEL, 2003). Portanto, oócitos em crescimento não são capazes de reiniciar e completar a meiose e são tidos como meioticamente incompetente (ARLOTTO et al., 1996), passando a ser competentes quando completam o seu crescimento.

O processo de maturação, que resulta na capacidade do oócito ser fertilizado ocorre, em duas fases: 1) fase de crescimento – capacidade de reiniciar a meiose. Nesta fase, ocorre a regulação da síntese de proteínas, concomitante com a formação de organelas como as mitocôndrias, os ribossomos, os grânulos corticais e vesículas contendo fontes energéticas, diferenciando a célula em um gameta funcional (CRAN et al., 1980; SCHULTZ, 1986; PAYNTON e BACHVAROVA, 1990; EPPIG, 1991; LANDIM-ALVARENGA, 2006) e 2) fase de maturação final – reinício da meiose ocorrendo após a puberdade no folículo pré-ovulatório. Nesta última fase ocorrem modificações nucleares e citoplasmáticas que irão, em conjunto, resultar na formação de um gameta com capacidade de ser fertilizado (CRAN et al., 1980; MOOR et al., 1981; SATHANANTHAN, 1994; LANDIM-ALVARENGA, 2006).

O reinício da meiose é caracterizado pela quebra da vesícula germinativa (QVG), com condensação da cromatina e formação do fuso da segunda divisão meiótica, seguida da extrusão do primeiro corpúsculo polar (1º CP) e progressão da prófase I para a metáfase da segunda divisão meiótica (M II). Neste momento ocorre uma segunda parada da meiose a qual permanece até a fertilização (EPPIG, 2001; VAN BLERKOM, 1991). Todos esses processos irão futuramente sustentar o desenvolvimento embrionário (EPPIG, 2001).

Após o espermatozoíde penetrar no oócito, ocorre a extrusão do segundo corpúsculo polar (2º CP), os pro-núcleos da fêmea e do macho se formam e ocorre a singamia iniciando o desenvolvimento embrionário. Mudanças nucleares durante a maturação e fertilização ocorrem e são coordenados por meio dos movimentos do material genético e das organelas e por meio de mudanças bioquímicas no citoplasma para garantir o desenvolvimento normal dos embriões (VAN BLERKOM, 1991).

Assim, as condições de cultivo *in vitro* para maturação nuclear e citoplasmática do oócito certamente têm um papel fundamental sobre a aquisição da competência (chamada também de capacitação oocitária), que é essencial para o desenvolvimento embrionário. Portanto, para o estabelecimento de um sistema de cultivo que possibilite a

produção de um maior número de embriões de boa qualidade, é fundamental a compreensão dos mecanismos envolvidos na maturação de oócitos (GOTTARDI e MINGOTI, 2009).

O processo de maturação inclui todos os eventos que permitem ao oócito expressar seu potencial máximo de desenvolvimento após a fecundação. Neste sentido, é uma das fases mais importantes da PIV de embriões, pois é nesse período que o oócito adquire capacidade para prosseguir nos próximos eventos (GOTTARDI e MINGOTI, 2009).

Embora os oócitos imaturos de mamíferos possam retomar a meiose após o isolamento a partir de folículos antrais (EDWARDS et al., 1965), a maturação citoplasmática acontece de forma assincrônica em relação a nuclear (JANSSENSWILLEN et al., 1995; HUANG et al., 1999). Durante a retomada espontânea da meiose, a cromatina condensa impedindo assim a síntese de RNA e a acumulação de várias moléculas essenciais para o início do desenvolvimento, ou seja, há um desarranjo entre maturação nuclear e citoplasmática. Para isso, foi sugerido a inibição ou o atraso espontâneo da maturação nuclear *in vitro*, que permitirá mais tempo para o oócito acumular as moléculas importantes para o desenvolvimento embrionário (BILODEAU-GOESEELS, 2012).

Uma das técnicas mais utilizadas para prolongar o tempo de maturação citoplasmática consiste na inibição ou no retardo da maturação nuclear, que permite uma transição mais regulada e apropriada da prófase I para a metáfase II (GILCHRIST, 2008). Dessa forma, a manutenção dos oócitos em estágio de VG por algumas horas, poderia resultar em oócitos mais competentes para serem utilizados nas técnicas de biotecnologias reprodutivas (CHOI et al., 2006). Paralelamente, os eventos da maturação citoplasmática levariam um maior tempo para ocorrer, podendo adquirir uma melhor competência para o desenvolvimento *in vitro* (WU et al., 2006).

O atraso da meiose pode ser obtido incubando-se os complexos *cumulus oophorus* (CCOs) ainda imaturos com agentes inibidores, sendo a maturação iniciada logo após a remoção dos inibidores (GILCHRIST e THOMPSON, 2007). Dentre esses agentes podemos destacar aqueles que elevam a adenosina monofosfato cíclica (cAMP): a) análogos da cAMP (dibutiril cAMP); b) inibidores da fosfodiesterase (PDE) não específico: isobutilmetilxantina (IBMX); c) inibidores da PDE específico: tipo 4 (rolipram), tipo 3 (milrinona, cilostamida, trequinsin, Org9935) e tipo 8 (dipiridamol); d) ativadores da adenilato ciclase: hormônio folículo estimulante (FSH), adenilato

ciclase invasiva e forskolin (BILODEAU et al., 1993; BILODEAU-GOESEELS, 2003; GILCHRIST e THOMPSON, 2007).

O dibutilil cAMP (dbcAMP), a isobutilmetilxantina (IBMX), e várias combinações de purinas (hipoxantina e adenosina) são efetivas em bloquear a meiose (SIRARD e FIRST, 1988), mas suas durações são limitadas. Entretanto os agentes mais utilizados são os inibidores da fosfodiesterase (PDE), por retardarem (e não bloquearem) a retomada da meiose (HOMA, 1988; SIRARD, 1990). A cilostamida e o milrinone atuam inibindo a PDE tipo 3 que encontra-se dentro do oócito, mantendo-o em metáfase I (M I) (THOMAS et al., 2002). O dipiridamol retarda a maturação indiretamente, pois a PDE tipo 8 encontra-se nas células do *cumulus* e na granulosa (MAYES e SIRARD 2002; THOMAS et al., 2002).

O forskolin consiste num eficiente inibidor da maturação nuclear em oócitos (RACOWSKY, 1984; HOMA, 1988; SIRARD e FIRST, 1988; SIRARD, 1990; BILODEAU et al., 1993). A cAMP derivada das células do *cumulus*, é transferida através dos prolongamentos intracelulares que penetram a zona pelúcida (ZP) até o ooplasma, consistindo em uma molécula reguladora da maturação nuclear. Portanto, um desarranjo do metabolismo funcional da comunicação entre oócitos e células do *cumulus* resultará na redução do cAMP intra-oocitário com consequente reinício da meiose (RACOWSKY, 1984). Dessa forma, se não agredirmos o contato existente entre as células do *cumulus* e da granulosa a prevenção da QVG será garantida (SIRARD 1990). Bilodeau et al. (1993) obteve altos níveis de cAMP sintetizadas em oócitos a partir de suas células do *cúmulus*, em resposta ao forskolin.

Sirard (1990) e Bilodeau et al. (1993) avaliaram que quando as concentrações da cAMP estão diminuídas, ocorre uma estimulação da maturação nuclear mas, quando a concentração intracelular deste componente é mantida elevada, a maturação é inibida, ou seja, ocorre um atraso na QVG, mesmo quando baixas concentrações de forskolin foram utilizadas. De acordo com a literatura, o recomeço da meiose, utilizando-se forskolin, pode ser atrasado por aproximadamente 4 horas (GILCHRIST, 2008).

O ciclo celular mitótico e meiótico é controlado pela atividade do fator promotor da fase M ou fator promotor da maturação (FPM) que é composto pela quinase catalítica Cdc2 e pela subunidade regulatória ciclina B (BILODEAU-GOESEELS, 2012).

O folículo ovariano contém fatores inibitórios indefinidos que mantêm o oócito bloqueado. O principal fator inibitório das paredes foliculares *in vitro*, segundo Richard e Sirard (1996), encontra-se nas células da teca e é liberado no meio de cultivo.

Para ocorrer o bloqueio da meiose, o receptor da proteína G (GPR3) ativa a proteína G a estimular a adenilato ciclase para sintetizar a cAMP. O agente bloqueador eleva os níveis de cAMP tornando a proteína quinase (PKA) ativa. Esta inativará a quinase catalítica Cdc2 mantendo o FPM inativo e o núcleo em estágio de VG (BILODEAU-GOESEELS, 2012) (Figura 1 A).

O contrário ocorre no processo normal da maturação, onde a GPR3 ativa a proteína G a estimular a adenilato ciclase. Como os níveis de cAMP estarão diminuídos, ocorrerá uma inativação da PKA e ativação da quinase catalítica Cdc2 e da subunidade regulatória ciclina B. Consequentemente ocorrerá uma ativação do FPM causando a QVG e a maturação (BILODEAU-GOESEELS, 2012) (Figura 1 B).

A variação da atividade do FPM pode ser detectada nos oócitos bovinos durante a maturação. Sua atividade é baixa no estágio de VG, passando a ser observada no início da QVG. Alcança um pico em M I, declina sua atividade durante a transição entre os estádios de M I e M II e eleva-se novamente para a entrada do oócito em M II. Sua inativação nos oócitos em estágio de M II é induzida pela fecundação ou pela ativação paternogenética (KUBELKA et al., 2000).

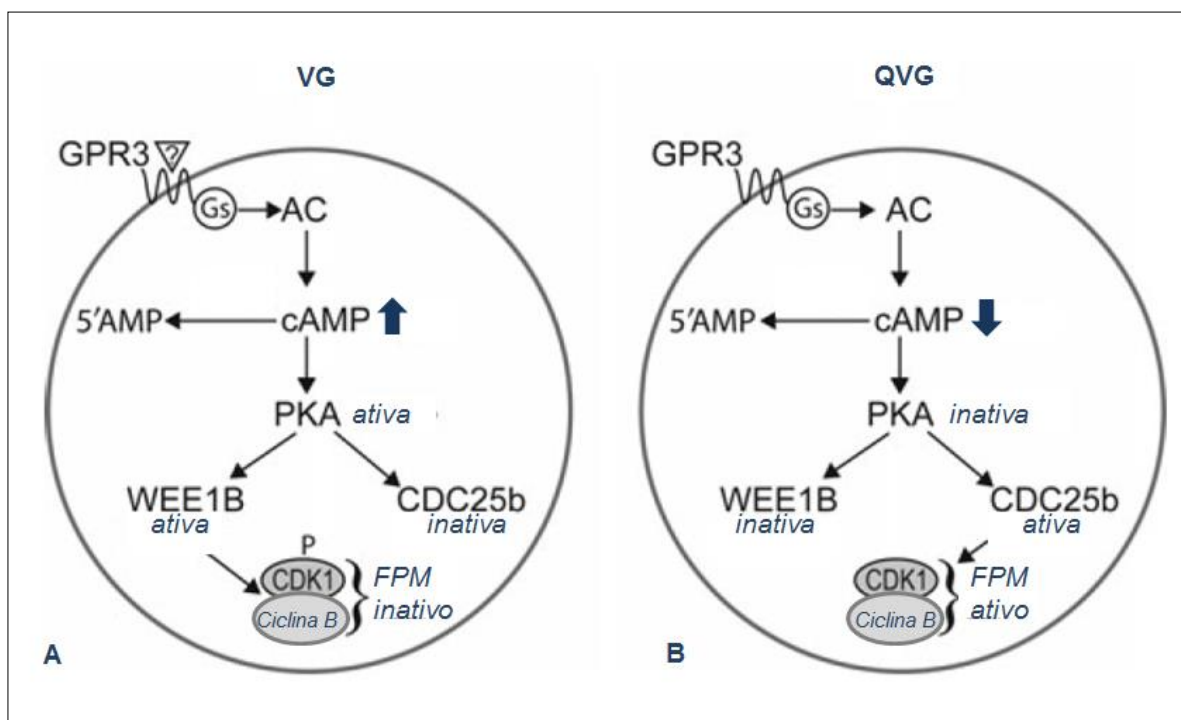


FIGURA 1: Esquema ilustrando os eventos do bloqueio e reinício da meiose oocitária. **A:** evento ocorrido durante o bloqueio da meiose, com o núcleo em estágio de vesícula germinativa (VG). Nesse caso o forskolin atua elevando os níveis de adenosina monofosfato cíclica (cAMP). **B:** evento normal da meiose oocitária, onde há uma diminuição nos níveis de cAMP, ativação do fator promotor de maturação (FPM), quebra da vesícula germinativa (QVG) e maturação oocitária (Adaptado BILODEAU-GOELSELS, 2012).

2 Maturação Citoplasmática

A habilidade do oócito ser fertilizado depende de uma maturação oocitária normal, tanto nuclear quanto citoplasmática. Como já visto, entende como maturação nuclear as mudanças que ocorrem no núcleo do oócito, mais especificamente a duplicação e divisão do DNA. Por sua vez, a maturação citoplasmática é caracterizada por diversas mudanças no formato e localização das organelas celulares. Estas estão intimamente relacionadas com a aquisição da competência meiótica e com a capacidade do oócito ser fecundado e de passar pelo desenvolvimento embrionário (HYTTEL et al., 1989). Apesar desses processos serem distintos, a maturação nuclear e citoplasmática, consiste num evento interligado, que ocorre simultaneamente, num determinado tempo, mas de forma assíncronica; embora a programação molecular do citoplasma já deva ter se iniciado durante a fase do crescimento oocitário.

A complexidade dos eventos que ocorrem durante a maturação do oócito depende não só da correta dinâmica de separação dos cromossomos da maturação nuclear, mas também da redistribuição das organelas citoplasmáticas e do acúmulo de RNA mensageiro (mRNA), proteínas e fatores de transcrição, necessários para que o processo se realize.

A transcrição e estocagem de proteínas no citoplasma são de fundamental importância para a maturação e para garantir a progressão do desenvolvimento inicial do embrião para o estágio de oito células, quando, em bovinos, o genoma embrionário é ativado e a síntese de novas proteínas é necessária. Essa fase é denominada “ativação do genoma embrionário” e a expressão de certos genes durante esse período irá determinar o sucesso da embriogênese no estágio de pré-implantação (MEIRELLES, 2004; FERREIRA et al., 2009).

Pode-se dividir a maturação citoplasmática em três eventos: a) redistribuição das organelas citoplasmáticas; b) maturação molecular e c) dinâmica dos filamentos do citoesqueleto (FERREIRA et al., 2009).

O processo de maturação citoplasmática pode ser interpretado como uma capacitação gradual que, juntamente com a maturação nuclear, favorece a capacitação funcional do oócito refletindo positivamente no desenvolvimento embrionário (FERREIRA et al., 2009). Desta forma, a maturação oocitária consiste num passo de suma importância do qual dependem todos os estágios subsequentes do desenvolvimento embrionário. No entanto, ainda se desconhece, em sua totalidade, o mecanismo fisiológico que mantém estas células estacionárias na meiose, ou o mecanismo que controla o reinício do processo de meiose no folículo pré-ovulatório (LANDIM-ALVARENGA, 2002).

2.1 Redistribuição das organelas citoplasmáticas

Já está bem estabelecido que, durante a maturação oocitária, inúmeras modificações ultraestruturais podem ser observadas com as organelas citoplasmáticas, tanto no que se refere à morfologia quanto à redistribuição. O tráfego das organelas citoplasmáticas durante a maturação é feito via citoesqueleto, através dos microfilamentos e microtúbulos, e seu reposicionamento depende das necessidades da célula em cada estágio de desenvolvimento (FERREIRA et al., 2009).

As mudanças em relação à morfologia e a redistribuição ultraestrutural de organelas podem ser observadas durante a maturação. Mitocôndrias, ribossomos, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e grânulos corticais, assumirão diferentes posições das observadas em estágio de VG (FERREIRA et al., 2009).

2.1.1 Ribossomos:

Os ribossomos são sintetizados pela transcrição de genes de RNA ribossomal (rRNA), pelo processamento dos transcritos e pela adição de inúmeras proteínas ribossomais às suas duas subunidades. A síntese de proteínas é indispensável não apenas para a progressão da maturação no oócito, mas também para a formação do zigoto e embriogênese inicial. Para isso, é necessário que uma quantidade adequada de ribossomos esteja presente durante a maturação (FERREIRA et al., 2009).

O oócito de um folículo primordial encontra-se quiescente, e o nucléolo é composto exclusivamente pela porção granular, sinalizando a ausência de atividade de síntese de ribossomos (FAIR et al., 2001; HYTTEL et al., 2001). Durante a meiose, no estágio de M I, há aproximadamente três vezes mais síntese de proteínas no oócito do que no estágio de QVG (Figura 2 A).

Entretanto, ao alcançar o estágio de M II, o oócito exhibe níveis basais de tradução de proteínas (Figura 2 A). Tal fato pode ser explicado pela ausência de um nucléolo funcional, uma vez que a cromatina está condensada em forma de cromossomos e, assim, não haveria a transcrição de rRNA e a consequente produção de ribossomos para a tradução do mRNA. Tais evidências afirmam a ideia de que a presença dos ribossomos está diretamente ligada à síntese proteica nos períodos cruciais do desenvolvimento (FERREIRA et al., 2009).

2.1.2 Retículo Endoplasmático (RE):

As membranas do retículo endoplasmático (RE) são fisiologicamente ativas, interagem com o citoesqueleto e contêm diferentes domínios especializados em funções distintas. Dentre as funções do RE descritas destacam-se o enovelamento de proteínas e sua degradação, o metabolismo de lipídeos, a compartimentalização do núcleo, a regulação do gradiente de íons cálcio (Ca^{2+}) e a síntese de membranas (LIPPINCOTT-SCHWARTZ et al., 2000).

As modificações bioquímicas e estruturais no RE durante a maturação são pontos cruciais para o funcionamento do sistema de regulação do cálcio intracelular. Em análises *in vivo* de oócitos de camundongos no estágio de VG, o RE apresenta-se uniformemente distribuído no ooplasma. Ao progredir o desenvolvimento até o estágio

de M II, observou-se que esta organela se apresenta em regiões corticais e acumula-se em forma de clusters, por todo o citoplasma, exceto nas proximidades do aparato meiótico (KLINE, 2000; STRICKER, 2006) (Figura 2 A).

Durante a fertilização, a entrada do espermatozóide no oócito leva a uma acentuada liberação de cálcio do retículo, que ativa o início do desenvolvimento (Figura 2 B). Sendo assim, no momento de formação do 2º CP, e 2 horas antes de cessar a sinalização de cálcio no estágio pró-nuclear do desenvolvimento, os clusters do RE se desagregam (JONES et al., 1995; STRICKER, 2006).

2.1.3 Complexo de Golgi (cG):

É constituído por um número variável de vesículas circulares achatadas e vesículas esféricas de diversos tamanhos que parecem originar das primeiras. Normalmente, localiza-se em posições constantes, quase sempre ao lado do núcleo. Uma de suas principais funções consiste na separação e endereçamento das moléculas sintetizadas nas células, encaminhando-as para as vesículas de secreção, para os lisossomos ou para a membrana celular (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2000).

Sabe-se que oócitos bovinos, no estágio de VG, apresentam fragmentos de cG que se transformam em vesículas durante a QVG (MORENO et al., 2002; PAYNE e SCHATTEN, 2003).

2.1.4 Grânulos corticais (GC):

Os grânulos corticais (GC) são derivados do cG (WESSEL et al., 2001), são organelas exclusivas dos oócitos, e sua composição inclui uma diversa população de proteínas, moléculas estruturais, enzimas e glicosaminoglicanas. Sua exocitose apresentada pelo oócito é um dos mecanismos mais comuns para a prevenção da polispermia (HOSOE e SHIOYA, 1997). Se houver fertilização por mais de um espermatozoide, o zigoto resultante sofrerá clivagens anormais e se tornará inviável, morrendo ainda no início das divisões mitóticas. O mecanismo de bloqueio é altamente conservado entre os grupos animais e se baseia na rápida modificação da matriz extracelular oocitária, pela liberação do conteúdo dos GC na superfície externa, após a ativação do oócito pela entrada do espermatozóide (HALEY e WESSEL, 2004) (Figura 2 B).

Sabe-se que em oócitos no estágio de VG, os GC apresentam-se distribuídos em clusters pelo citoplasma (HOSOE e SHIOYA, 1997) e, ao final do período de maturação, quando esses oócitos atingem o estágio de M II, os grânulos encontram-se distribuídos por toda a superfície interna, próximos à membrana plasmática

(THIBAUT et al., 1987; WESSEL et al., 2001), estrategicamente dispostos, à espera da ativação (Figura 2 A).

2.1.5 Mitocôndrias:

As mitocôndrias são herdadas maternalmente e possuem a capacidade de autorreplicação (CUMMINS, 2004). Possuem seu próprio material genético, o DNA mitocondrial (DNAm), que é derivado exclusivamente do DNAm materno (CUMMINS et al., 1997). Existem cerca de 100.000 a 200.000 cópias de DNAm num oócito mamífero (REYNIER et al., 2001), as quais são divididas entre todas as células filhas durante o desenvolvimento embrionário.

No citoplasma de oócitos mamíferos, seu número, pode variar de acordo com o estágio de desenvolvimento da célula. Por exemplo, durante o estágio pré-migratório das células germinativas, o número de mitocôndrias é de aproximadamente 10 unidades, aumentando para 200 unidades no estágio de oogônia, para aproximadamente 6.000 em oócitos primários e acima de 100.000 durante a maturação citoplasmática (TARAZONA et al., 2006).

Existe um grande interesse em entender melhor as funções mitocondriais durante a maturação oocitária e desenvolvimento de blastocistos iniciais (NISHI et al., 2003). Desta forma, possuem importância fundamental no metabolismo oocitário, sendo responsável por suprir a energia (adenosina trifosfato = ATP) que é consumida durante a maturação, incluindo motilidade, manutenção da homeostase celular e regulação da sobrevivência da célula (ST JOHN, 2002).

Fundamental para o metabolismo oocitário, as mitocôndrias, atuam suprindo a energia que é consumida durante a maturação. Sua migração para as áreas de alto consumo de energia é crucial para os oócitos e para os blastômeros do embrião durante períodos críticos do ciclo celular. Os padrões de distribuição das mitocôndrias e sua atividade metabólica passam por mudanças durante a maturação oocitária em várias espécies e, sua migração para diferentes regiões do citoplasma é mediada por uma rede de citoesqueleto de microtúbulos (VAN BLERKOM, 1991).

Essas organelas sintetizam a ATP por um processo de fosforilação oxidativa (OXPHOS – CUMMINS, 2004), necessária para a síntese de proteínas, as quais suportam a finalização dos processos subsequentes de maturação e do desenvolvimento embrionário (KRISHER e BAVISTER, 1998; STOJKOVIC et al., 2001). Histologicamente, no interior das mitocôndrias, encontra-se a matriz que é um complexo concentrado de centenas de enzimas, as quais estão relacionadas com o ciclo

do ácido cítrico (ciclo de Krebs), com a β -oxidação de ácidos graxos e com a replicação, transcrição e tradução do DNAm (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999; 2000).

Os lipídeos, na forma de triglicerídeos, possuem um papel importante no metabolismo energético durante a maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial (AMBRUOSI et al., 2009), pois são metabolizados pela β -oxidação e pelo ciclo de Krebs dentro da matriz mitocondrial. Para essa metabolização ocorrer, as mitocôndrias e as gotas lipídicas devem localizar-se próximas, formando uma unidade metabólica com um suprimento de oxigênio (O_2) garantido, para ocorrência dos processos oxidativos (STURMEY et al., 2006). Se ocorrer uma inibição do transporte do lipídio para dentro da mitocôndria durante a maturação oocitária, o desenvolvimento embrionário será interrompido.

As células animais, em geral, podem produzir energia gerando ATP basicamente por duas vias metabólicas: pela conversão da glicose em piruvato, por meio da glicólise, ou pela oxidação dos substratos piruvato ou oxalacetato, via ciclo de Krebs (BEITZ, 1996; NELSON e COX, 2005). O primeiro mecanismo encontra-se no citoplasma e o segundo, nas mitocôndrias (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999; 2000).

O metabolismo da glicose através do ciclo de Krebs resulta em maior produção de energia (ATP) que a glicólise. Entretanto, o metabolismo da glicose pode ser importante para a produção do RNA e da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida (NADP) usadas nos processos celulares, assim como para a redução da glutathione intracelular, um importante oxidante, e para a síntese de purinas. A produção de energia e as espécies reativas de oxigênio (ROS) estão intimamente ligadas e alterações na oxidação resultarão numa função mitocondrial debilitada (KRISHER, 2004).

Além das mitocôndrias estarem relacionadas com o fornecimento de ATP, elas também estão envolvidas com a concentração de cálcio em regiões específicas dos oócitos fertilizados ou não. Então, a distribuição dessas mitocôndrias pode ser um indicativo de requerimento de energia ou de íons para vários eventos durante a maturação oocitária, fertilização e desenvolvimento embrionário, ou seja, pode ser resultado de uma alta procura por ATP e Ca^{2+} durante ou após a maturação citoplasmática (KRISHER, 2004). Assim, uma maturação *in vitro* citoplasmática inadequada ou uma fertilização *in vitro* anormal prejudicará o desenvolvimento embrionário (SUN et al., 2001).

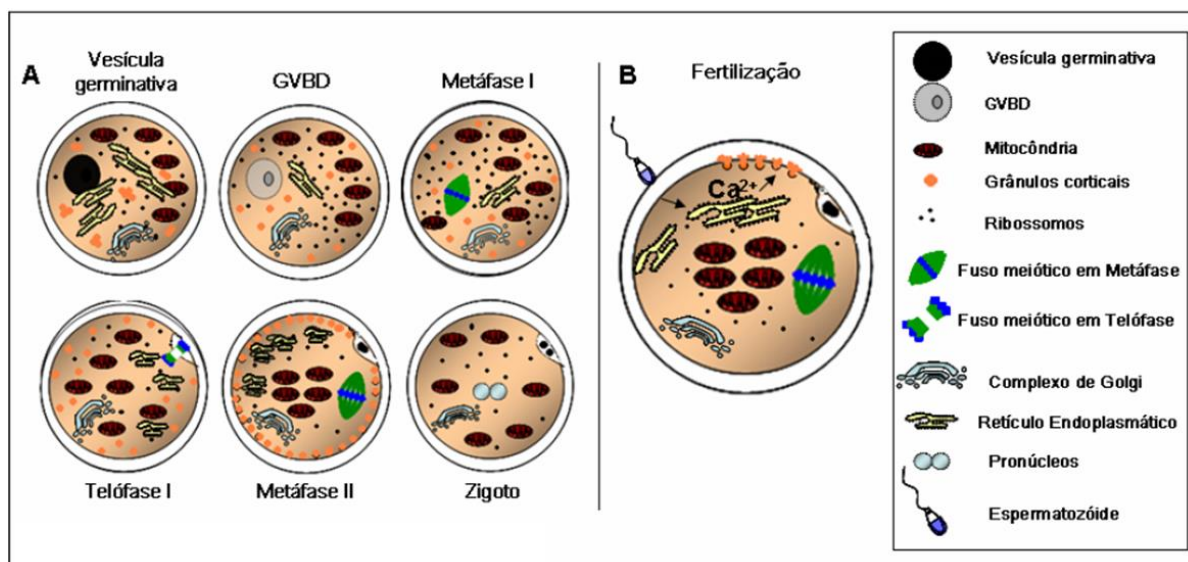


FIGURA 2: Esquema da distribuição das organelas citoplasmáticas durante a maturação, fertilização e formação do zigoto bovino. **A:** progressão da maturação nuclear e movimentação das organelas citoplasmáticas, desde o estágio de vesícula germinativa (VG) até a metáfase II (M II) e estágio de formação do embrião. **B:** distribuição das organelas, disposição dos grânulos corticais (GC) e fecundação do espermatozóide (Adaptado FERREIRA et al., 2009).

As mitocôndrias também possuem um importante papel na regulação do processo da apoptose, pois agem como reservatórios de proteínas ativadoras e efetoras do processo de morte celular programada (MCP), como por exemplo, do citocromo c; e uma permeabilização da membrana mitocondrial acarretará numa liberação deste, com consequente ativação da cascata do processo de apoptose e consequentemente morte celular (PARONE, 2002).

2.2 Modificações ultraestruturais nas mitocôndrias conforme sua reorganização no desenvolvimento celular

Os diferentes padrões de distribuição e atividade da mitocôndria têm sido descritos em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário, principalmente na fase inicial e, esse cenário tem sido um parâmetro importante para acessar o potencial de competência do oócito e do embrião (TARAZONA et al., 2006). Com isso a mitocôndria pode ser usada para estimar a maturação citoplasmática, devido à maturação *in vitro* (MIV) do oócito ser acompanhada pelas mudanças em suas distribuições (TORNER et al., 2004).

Em oócitos imaturos as mitocôndrias são estruturalmente imaturas, de forma redonda ou oval, com poucas cristas e vários vacúolos (TARAZONA et al., 2006). São poucos os oócitos imaturos que apresentam mitocôndria em atividade, provavelmente por serem imaturas. Dessa forma a energia nessa fase oocitária provavelmente é fornecida passivamente pelas células da granulosa (TANGHE et al., 2002; FAIR, 2003).

As mitocôndrias de oócitos que estão passando pela maturação, após 12-18 horas de cultivo, movem-se da posição periférica para uma mais dispersa dentro do citoplasma. Entretanto, quando os oócitos alcançam a metáfase, as mitocôndrias, juntamente com gotas lipídicas, ocupam uma posição central (HYTTEL et al., 1997). Essa organização da mitocôndria associada às gotas lipídicas consiste em um indicativo de requerimento de energia durante a MIV (STURMEY et al., 2006).

Em fase de M I, o número e o tamanho das gotas lipídicas aumentam e as mitocôndrias se agrupam ao redor das gotas e o aglomerado tende a atingir todo o ooplasma. Numerosos ribossomos aparecem especialmente ao redor dos cromossomos e o complexo de Golgi diminui imensamente seu tamanho (HYTTEL et al., 1997).

Oócitos em M II possuem grânulos corticais, em sua maioria, distribuídos perifericamente no ooplasma. As mitocôndrias juntamente com as gotas lipídicas, ocupam a região central na célula, deixando a periferia livre de organelas, onde as características mais proeminentes são resquícios de retículo endoplasmático liso (REL).

O aumento do nível de agregação da mitocôndria ao redor do núcleo indica maturação oocitária, durante a qual a distribuição mitocondrial muda de um estado homogêneo para um heterogêneo (WANG et al., 2009). A ausência da agregação das mitocôndrias ao redor do núcleo indica parada na maturação oocitária. A razão dessa agregação mitocondrial ao redor do núcleo não se encontra bem esclarecida, mas algumas possibilidades são sugeridas (NISHI et al., 2003). Existe, portanto, uma teoria mais aceita que segundo Van Blerkom et al., (2003) o acúmulo perinuclear mitocondrial deva fornecer ATP para a QVG.

Com essas modificações, o oócito já é considerado maduro, com uma constituição celular biológica desenvolvida e modulada a ponto de iniciar uma fertilização e sustentar um desenvolvimento embrionário. O aumento gradual do lipídio no final da maturação é de suma importância para esse início do desenvolvimento (HYTTEL et al., 1997).

Após a MIV a atividade mitocondrial no citoplasma aumenta, preenchendo todo o citoplasma oocitário (TARAZONA et al., 2006). São necessários altos níveis de atividade mitocondrial para os eventos convencionais da maturação dependentes de ATP. Em caso de cultura oocitária inapropriada poderá inibir essa mudança da mitocôndria para o citoplasma e então afetar-se-á toda maturação citoplasmática (TORNER et al., 2004). A redistribuição das mitocôndrias em diferentes áreas celulares é realizada por citoesqueleto, especificamente por um conjunto de microtúbulos (VAN BLERKOM, 1991) e uma formação inapropriada desses microtúbulos no citoplasma pode levar a uma distribuição anormal das mitocôndrias. Com isso poderá ocorrer um retardamento ou mesmo uma parada no desenvolvimento oocitário, afetando a embriogênese em função da falha na distribuição do ATP (NAGAI et al., 2006). Isso porque é de extrema importância a energia elevada ao redor do núcleo durante o desenvolvimento embrionário (WANG et al., 2009).

Em embriões pré-implantados foi observado uma alta concentração de mitocôndrias ao redor do núcleo. Entretanto, a própria distribuição de mitocôndrias ativas durante a maturação oocitária é necessária para o desenvolvimento embrionário (WANG et al., 2009). Após a fertilização e durante o início do desenvolvimento embrionário, a mitocôndria já madura, formará novas cristas. Nessa fase existem mitocôndrias com diferentes níveis de atividade (TARAZONA et al., 2006).

A segregação mitocondrial é assimétrica em embriões em todos os estágios até a formação de blastocisto, exceto na fase de duas células. Em relação à distribuição das mitocôndrias dentro dos compartimentos são encontrados tanto padrões difusos quanto peri-citoplasmático. Normalmente os blastocistos expandidos são os que possuem mitocôndrias mais distribuídas na região peri-nuclear o que indica uma possível associação com um aumento na atividade nuclear para a produção de mRNA necessário para preparar o citoplasma do embrião para implantações em estágios subsequentes (TARAZONA et al., 2006).

Quando o blastocisto eclode, as mitocôndrias dentro de cada blastômero mudam da região peri-nuclear para uma peri-citoplasmática, enquanto que as células da massa celular interna (MCI) se mantêm inalteradas. Isso pode ser explicado pelo fato das células do trofoblastos estarem começando a expressar as proteínas de adesão, assim como outras moléculas importantes para o reconhecimento materno do embrião. O rearranjo do citoplasma para preparar as células do trofoblasto para um reconhecimento e adesão maternal consome muito mais ATP, contribuindo para a migração da

mitocôndria à membrana plasmática e demandando mais energia que na MCI (TARAZONA et al., 2006).

De 72 a 168 horas após FIV, os embriões apresentam uma baixa atividade mitocondrial (TARAZONA et al., 2006), ou seja, necessitam de uma ATP produzida pelas mitocôndrias via lactato e piruvato (LANE e GARDNER, 1998; TARAZONA et al., 2006) e o embrião começa a utilizar outras vias metabólicas como a glicólise anaeróbica para produzir energia. Nenhum embrião possui uma atividade mitocondrial muito alta e, uma possível explicação para isso é que oócitos e embriões necessitam de certo limiar de OXPHOS para sobreviver, e esse limiar muda durante o movimento do embrião pelo útero, onde o nível de oxigênio é menor que no oviduto (CUMMINS, 2004).

O oxigênio é essencial para a conversão de adenosina difosfato (ADP) em ATP na OXPHOS, sendo um receptor de elétrons na cadeia de transporte de elétrons. Entretanto, o uso do oxigênio como um substrato energético também resulta na produção de ROS, particularmente o ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (OH^-) (HARVEY et al., 2002). A atividade das mitocôndrias encontrada em embriões antes da ativação do genoma está relacionada com a proteção das ROS produzidas pelo metabolismo mitocondrial (NOHL et al., 2005).

As ROS são altamente ativas como receptores de elétrons, e capazes de tirar elétrons de outras moléculas que, por sua vez, se tornam radicais livres (HARVEY et al., 2002). Entretanto, se a atividade mitocondrial for alta durante as primeiras clivagens o embrião poderá morrer, pois ele não será capaz de eliminar o excesso de radicais livres produzido (TARAZONA et al., 2006).

Um pequeno aumento na concentração Ca^{2+} intracelular pode ativar e regular a maturação nuclear e citoplasmática espontaneamente. O aumento do Ca^{2+} intracelular desencadeia a QVG em suínos (KRISHER, 2004). Da mesma forma, em oócitos bovinos a absorção do Ca^{2+} resulta na QVG espontaneamente (HOMA, 1995).

2.3 Sondas Fluorescentes Marcadoras de Mitocôndrias

Certas sondas, como a JC-1 (5,5', 6,6' -tetrachloro- 1,1', 3,3' -tetraethyl benzimidazolyl carbocyanine iodide), são usadas para medir a taxa de respiração de oócitos e embriões por se acumular preferencialmente dentro das mitocôndrias (WILDING et al., 2001). Wilding et al. (2001) definiram dois padrões mitocondriais a

partir dessa sonda: Tipo A: são as mitocôndrias encontradas em oócitos imaturos, que apresentam VG. Essas mitocôndrias aparecem abaixo da membrana plasmática (mitocôndrias subplasmais). Tipo B: são as mitocôndrias encontradas em oócitos maduros, que se localizam por todo o ooplasma, principalmente na região central do oócito.

Breveni et al. (2005) também avaliaram as mudanças mitocondriais dentro do citoplasma de oócitos suínos com a mesma sonda. A partir de oócitos (sem distinguir imaturos e maduros) foi possível observar quais possuíam ooplasma maduro. As mitocôndrias presentes na periferia do oócito indicavam uma imaturidade celular e quando as mesmas se encontravam distribuídas em todo o ooplasma significava uma maturação celular. Esse último fenômeno indicava um desenvolvimento oocitário com uma atividade mitocondrial ativa. A inexistência da migração das mitocôndrias ativas para o citoplasma em geral está relacionada com a ausência de uma formação apropriada e conveniente das redes de microtúbulos do citoplasma (BREVENI et al., 2005). Reynaud et al. (2001) definiram a Mitotracker Red CMX Ros como o corante lipofílico mais utilizado por passar passivamente por difusão pela membrana plasmática e acumular-se apenas em mitocôndria metabolicamente ativas.

A Mitotracker Orange CMTM Ros consiste numa outra sonda que é sequestrada rapidamente por mitocôndrias com respiração ativa, dependendo de sua atividade oxidativa (TORNER et al., 2004; AMBRUOSI et al., 2009; KATSKA-KSIAZKIEWICZ et al., 2011). Ambruosi et al. (2009), ao avaliarem a distribuição mitocondrial em equinos maturados que estavam em M II, definiram três padrões citoplasmático em oócitos: 1) distribuição homogênea de pequenos grânulos de mitocôndria: citoplasma imaturo; 2) distribuição heterogênea de pequenos e/ou grandes grânulos de mitocôndria: citoplasma maduro (ativo) e 3) acumulação de mitocôndria na periferia citoplasmática e/ou ao redor do núcleo: maturação citoplasmática completa.

2.4 Maturação Molecular

Para que o oócito tenha plena capacidade de desenvolver-se em embrião é necessário aumentar seu tamanho, acumular mRNA e energia, distribuir e aumentar suas organelas e sincronizar esses eventos ao reinício da meiose (HYTTEL et al., 1997).

A maturação molecular envolve a transcrição, estoque e processamento de mRNA que serão traduzidos em proteínas pelos ribossomos e essas proteínas estão envolvidas no processo de maturação e nos eventos celulares subsequentes como fertilização, formação dos pró-núcleos e fase inicial da embriogênese (SIRARD, 2001). Entretanto, pouco se conhece sobre a maturação molecular, pois nem sempre esta pode ser detectada em nível estrutural.

Como grande parte dos transcritos será consumida previamente à ativação do genoma embrionário, seu correto armazenamento no citoplasma do oócito torna-se fundamental, uma vez que, após a retomada da meiose, não há mais expressão gênica e, portanto, tudo o que foi produzido durante a fase de crescimento deverá ser metabolizado no momento adequado. O mRNA transcrito durante a maturação molecular do oócito é acumulado em uma forma estável, porém transitoriamente inativa (SIRARD, 2001).

A maquinaria biossintética do citoplasma processa esse mRNA em partículas ribonucleoproteínicas (DAVIDSON, 1986) e, nessa forma empacotada ele será protegido da degradação nucleolítica e permanece estocado até o recrutamento para a tradução em sinais específicos gerados tanto na maturação quanto no desenvolvimento embrionário inicial (FULKA Jr. et al., 1998). As maiores causas de falha na maturação oocitária são o armazenamento, processamento e recrutamento inapropriado do mRNA materno (BREVINI GANDOLFI et al., 1997).

Segundo Tomek et al. (2002) a poliadenilação, que consiste na adição de adenina à porção terminal 3' do mRNA, estimula a liberação de moléculas repressoras acopladas à porção 5', permitindo assim o início da tradução do mRNA. Assim sendo, mRNAs com cauda poli-A curta serão traducionalmente inativos devido à sua baixa estabilidade, e o aumento desta cauda, por ação da enzima poli-a polimerase, determinará a tradução do mRNA (LEQUARRE et al., 2004).

Esse processo de poliadenilação é iniciado no núcleo e o transporte do mRNA para o citoplasma é feito por meio de um encurtamento característico da cauda poli-A (splicing) que, ao alcançar tal compartimento, torna-se menor no tamanho e heterogêneo (TOMEK et al., 2002). Sabe-se que quando as moléculas de mRNA possuem caudas poli-A curtas, elas não são efetivamente traduzidas e a deleção dessa sequência é um passo inicial do processo de degradação (TOMEK et al., 2002). O prolongamento citoplasmático da cauda poli-A no entanto, está relacionado à ativação da tradução, isto é, a adição de adenina ao mRNA no citoplasma do oócito durante a maturação, leva à

tradução das proteínas, e a deadenilação, por sua vez, leva à degradação desse mRNA (FERREIRA et al., 2009).

Assim, os fatores citoplasmáticos que originam durante o desenvolvimento e maturação dos oócitos são essenciais para a capacidade do desenvolvimento, aquisição da competência meiótica, fecundação e desenvolvimento embrionário. Os oócitos com uma maturação nuclear normal, em tempo regular, mas que possuem uma assincronia entre a maturação citoplasmática e molecular não serão fecundados e não terão um desenvolvimento embrionário (BLONDIN e SIRARD, 1995; BEVERS et al., 1997).

2.5 Dinâmica dos Filamentos do Citoesqueleto

Os filamentos do citoesqueleto são estruturas dinâmicas e adaptáveis, que podem sofrer alterações ou não de acordo com as necessidades da célula (ALBERTS et al., 2004).

Existem três tipos de filamentos no citoesqueleto que são formados por subunidades características de cada um. Os microtúbulos são formados por subunidades globulares e compactadas de tubulinas; os filamentos de actina são formados pelas subunidades globulares e compactadas de actina; e os filamentos intermediários são formados por subunidades polipeptídicas alongadas e fibrosas, que se arranjam em um tetrâmero, análogo à tubulina e à actina nos microtúbulos (FERREIRA et al., 2009).

O movimento de contração e descontração do citoesqueleto, em particular dos microtúbulos e microfilamentos, atua como um importante papel na regulação da formação do fuso meiótico (organelas dinâmicas), alinhamento e segregação dos cromossomos, movimento do material genético da posição central para a posição cortical, e extrusão do 1º e 2º CP (ALBERTS et al., 2004; LI et al., 2005).

Durante o período de crescimento dos oócitos, no estágio de VG, o rearranjo espacial das organelas se deve à modificação da organização do citoesqueleto, que assumem posições definidas (ALBERTINI, 1992; Figura 3). Após a QVG, os ásters de microtúbulos aparecem próximos à cromatina condensada e durante a transição do estágio de VG até anáfase I, os microfilamentos ou filamentos de actina distribuem-se na área cortical, abaixo do oolema, sem se conectarem com os microtúbulos (LI et al., 2005) (Figura 3).

Já em M I, os microtúbulos são nucleados pela polimerização da tubulina, a partir dos centrossomos ou centros organizadores de microtúbulos no citoplasma do

oócito, formando o fuso meiótico e a placa metafásica, onde os cromossomos estão dispostos equatorialmente (ALBERTINI, 1992; ALBERTS et al., 2004; FAN e SUN, 2004). A placa metafásica em M I é proporcionalmente maior do que a que é formada em M II o que poderia ser explicado pela redução do número de cromossomos que, agora, correspondem à metade do número inicial e, nessa fase, os filamentos de actina estão fortemente distribuídos na região cortical e ausentes entre os microtúbulos. O fuso tem uma forma de barril e seus polos são achatados (LI et al., 2005) (Figura 3 A).

O fuso se alonga e uma grande quantidade de filamentos de actina passa a ser observada ao redor dos cromossomos. No estágio de telófase I, os microtúbulos que estão entre os conjuntos cromossômicos formam uma estrutura triangular e a porção mais larga do cone de microtúbulos está ligada ao conjunto cromossômico destinado à extrusão, constituindo, assim, o 1º CP. A porção mais fina encontra-se associada ao conjunto que irá permanecer no oócito e entrar na M II (LI et al., 2005).

Portanto, durante a meiose, esse sistema estrutural do citoesqueleto tem ainda um papel fundamental: garantir que quase todo o citoplasma da célula em divisão permaneça no oócito secundário, já que este acumulou toda a informação necessária para a progressão das etapas subsequentes, e eliminar apenas uma pequena porção citoplasmática, no momento da extrusão dos corpúsculos polares (LI et al., 2005).

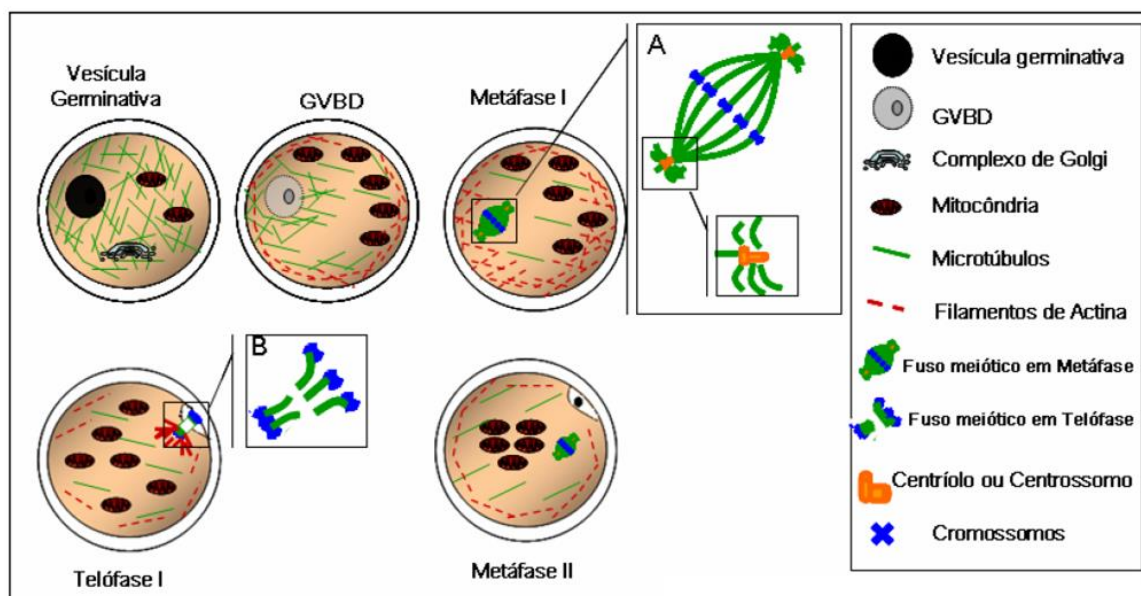


FIGURA 3: Dinâmica dos filamentos do citoesqueleto durante a maturação citoplasmática e nuclear de oócitos bovinos. **A:** detalhe do fuso meiótico em metáfase I (M I) e a estrutura do centríolo / centrossomo. **B:** detalhe do fuso meiótico em telófase I, em que podemos ver os microtúbulos entre os conjuntos cromossômicos (Adaptado FERREIRA et al., 2009).

3 Visão Atual de Embriões Bovinos Produzidos *in vitro* (PIV) no Brasil

Em 2011, encontrou-se uma produção de 350.762 embriões bovinos no Brasil sendo que 90,7% foram PIV. Esses dados representam um aumento de 15,7% em relação ao total de embriões produzidos em 2010. O crescimento no total de embriões em 2011 pela PIV confirma que essa técnica além de substituir a transferência de embriões (TE) possibilitou a expansão do mercado nacional (VIANA, 2012).

O aumento significativo no número de embriões produzidos em 2011 foi associado a dois fatores basicamente: o primeiro foi uma recuperação no mercado de embriões de raças de corte, pois após cinco anos de progressiva retração, em 2011 houve um aumento de 12,6% na produção de embriões nas raças de corte. Esse aumento deveu-se principalmente pela raça Nelore, que voltou ao patamar alcançado em 2005 quando foi comunicada a produção de mais de 210.000 embriões (VIANA, 2012).

O segundo fator referente ao aumento na produção de embriões no ano de 2011 foi a associação da PIV com raças leiteiras. Esse crescimento é decorrente provavelmente à disponibilidade de sêmen sexado e de seu uso na PIV de embriões. Em 2011 houve um crescimento expressivo (+ 27,0%) na produção de embriões em raças de leite e grande parte deste aumento foi relacionada ao número de transferências da raça Girolanda (VIANA, 2012).

A PIV também pode ter sido redirecionada de seu objetivo inicial de expansão da base de animais puros para a exploração do potencial da raça em cruzamentos, principalmente com a Holandesa. O uso da PIV para a produção de cruzamentos demonstra que esta biotécnica pode ser a alternativa para se explorar efetivamente os benefícios da heterose em bovinos. Paralelamente abre um mercado para os laboratórios comerciais, tanto no país como no exterior, assim como uma alternativa ao mercado de raças puras que é impulsionada pela distância genética entre os rebanhos elite e os comerciais e que por sua vez tende a ser reduzida pela própria adoção de biotécnicas reprodutivas (VIANA, 2012).

A participação do Brasil no total de embriões produzidos no mundo na última década reflete a evolução do uso das tecnologias de embrião no mercado nacional. A substituição da superovulação pela PIV como técnica de eleição para a produção de embriões bovinos, ocorrida de forma acentuada a partir de 2005, resultou na progressiva redução da participação do país no total de embriões produzidos *in vivo* a partir deste ano. Em contraste, a participação no total de embriões produzidos *in vitro* aumentou de

menos de 10% em 2001 para quase 70% em 2009, ano em que o Brasil respondeu por mais de 1/4 do total de embriões bovinos produzidos no mundo (VIANA, 2012).

O aumento na PIV de embriões em outros países também é esperado e, em alguns casos, é consequência direta da atuação de empresas brasileiras com filiais ou parcerias no exterior (VIANA, 2012), pois o número total de PIV transferidos no mundo foi de 373.836 em 2011, sendo o Brasil responsável por 85% desse montante (STROUD, 2012). Essa conquista pode ser atribuída também ao grande número de oócitos recuperados *in vivo* (ovum pick-up – OPU) (PONTES et al., 2011).

4 Produção *in vitro* (PIV) de Embriões Bovinos e o Reflexo da Presença do Soro Fetal Bovino (SFB)

Quase todos os meios usados para o desenvolvimento de embriões PIV contêm soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA) como fontes proteicas. Mucci et al. (2006) tem demonstrado o efeito favorável dessas substâncias por fornecerem substrato energético, aminoácidos, vitaminas, fatores de crescimento e quelantes de metais pesados.

A adição do SFB é um fator importante no cultivo *in vitro* de embriões bovinos por acelerar o desenvolvimento de mórula e blastocisto (KANE e BAVISTER, 1988). Por outro lado, as mórulas em pré-compactação requerem um meio quimicamente definido sem suplementação sérica para seu desenvolvimento (McKIERNAN et al., 1991). Entretanto, algumas controvérsias do SFB existem na literatura por possuir um efeito bifásico, inibindo o desenvolvimento embrionário durante as primeiras clivagens e estimulando a compactação da mórula e formação do blastocisto em estágios mais avançados do desenvolvimento (PINYOPUMMINTR e BAVISTER, 1991).

No entanto, a adição de SFB tem sido apontada como o principal responsável pelas diferenças morfológicas (DORLAND et al., 1994; ABE et al., 1999a) e fisiológicas (KRISHER et al., 1999; RIZOS et al., 2003) em embriões PIV, como por exemplo, o aumento no número e tamanho dos grânulos lipídicos (ABE et al., 1999b; 1999b; 2002; RIZOS et al., 2003; ABE et al., 2004) o que influencia a qualidade embrionária (FERGUSON e LEESE, 1999; SATA et al., 1999).

É bem provável que esse lipídio citoplasmático provenha do SFB do meio de cultivo, pois segundo Sudano et al. (2011) com a redução sérica desses meios o

conteúdo lipídico diminuiu e aumentou a sobrevivência pós-criopreservação (ABE et al., 2002; MUCCI et al., 2006).

Os níveis de lipídios citoplasmáticos observados em embriões PIV podem também estar relacionados com a quantidade e qualidade de mitocôndrias existentes nos blastômeros. Existe uma relação entre a morfologia da mitocôndria e o acúmulo de lipídio nas células, sendo que uma quantidade grande de lipídios seria resultado de um metabolismo mitocondrial insuficiente (CROSIER et al., 2001). Nesse contexto, em embriões PIV, aparentemente ocorre um efeito deletério na função mitocondrial o que resultaria em uma diminuição do consumo do conteúdo lipídico (ABE et al., 1999b; CROSIER et al., 2001; ABE et al., 2002) indicando um impacto negativo sobre o desenvolvimento embrionário (CROSIER et al., 2001).

Como os triglicerídeos são metabolizados por meio de β -oxidação dentro das mitocôndrias (STURMEY et al., 2006) essa associação de lipídios e mitocôndrias consiste num indicativo de alta atividade metabólica na célula. A mitocôndria produz ATP, que será utilizada pelas células do trofoblasto para a formação da blastocle e pelas células do botão embrionário para a diferenciação das células do embrião. O fato de não terem sido observadas diferenças na quantidade lipídica durante o decorrer do desenvolvimento embrionário, indica que o lipídio é continuamente sequestrado pelas mitocôndrias, durante o crescimento do embrião (CROSIER et al., 2001).

Frente a esses efeitos, certas substâncias que induzem a lipólise vêm sendo utilizadas para melhorar a qualidade dos embriões PIV. Men et al. (2006); Paschoal et al. (2009; 2012) demonstraram que a lipólise química utilizando o forskolin na concentração de 10 μ M melhorou a qualidade dos embriões e aumentou sua criotolerância quando foram cultivados na presença de SFB.

O forskolin (7β -acetoxi-8,13-exepoxi-1 α ,6 β ,9 α -triidroxi-Labd-14-en-11-one, $C_{22}H_{34}O_7$), derivado da família dos dipertenos (SEAMON et al, 1981; SEAMON e DALY 1981; BILODEAU-GOESEELS, 2006) é um agente ativador da adenilato ciclase, que atua em células intactas e está relacionado aos níveis de cAMP importante para as funções fisiológicas de vários sistemas (SEAMON et al., 1981; HO e SHI, 1982; EK et al, 1997; ARRESE et al, 1999; MEN et al., 2006; CUELLO et al., 2013).

O forskolin consiste num método alternativo para melhorar a taxas de PIV reduzindo o conteúdo lipídico embrionário. Esse agente lipolítico induz potencialmente a ativação da adenilato ciclase. Essa enzima ativa uma lipase endógena por meio da

cAMP e da proteína quinase (PKA), causando liberação do glicerol (CUELLO et al., 2013) (Figura 4).

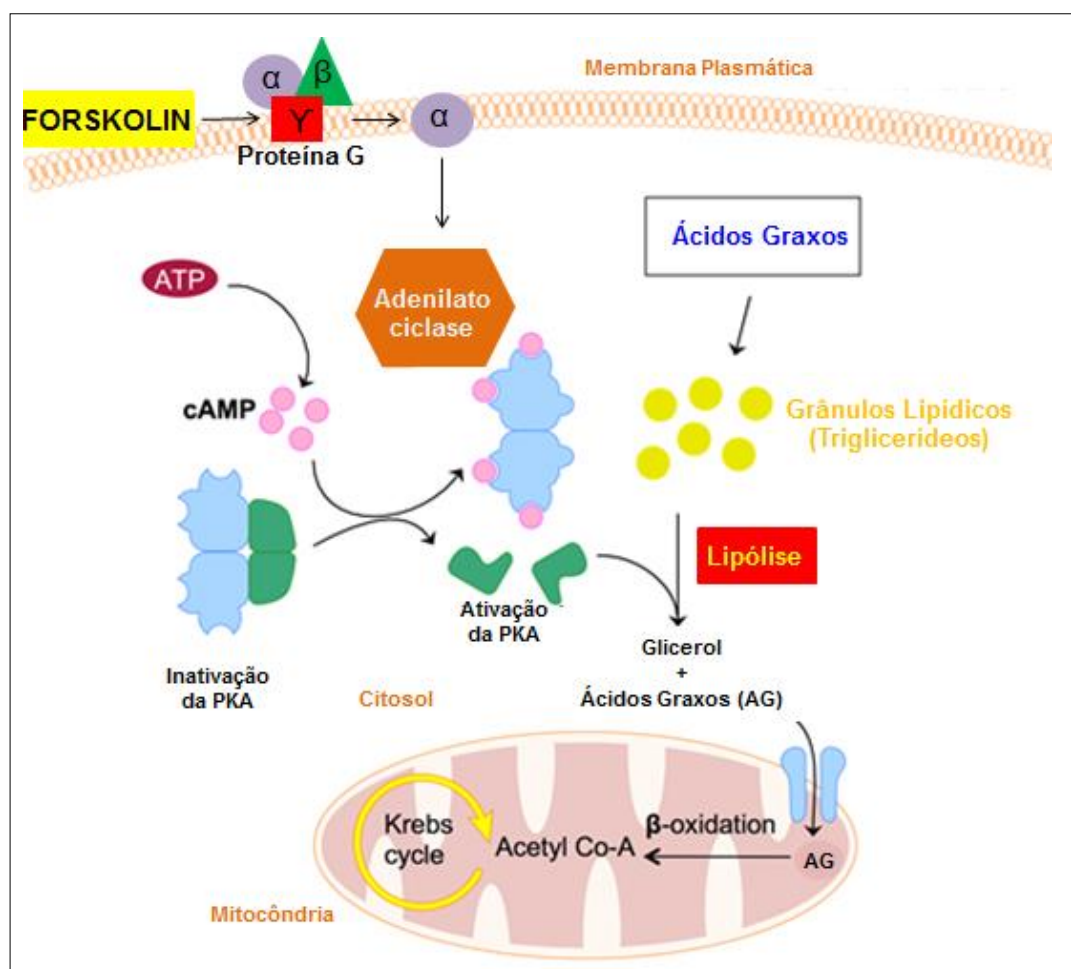


FIGURA 4: Esquema da ação do forskolin como agente lipolítico no embrião: ativação da adenilato ciclase, da adenosina monofosfato cíclica (cAMP) e liberação do glicerol (Adaptado SUDANO et al., 2013).

Em termos bioquímicos, a ligação da proteína G (molécula de sinalização) ao seu receptor causará uma hidrólise nessa proteína, liberando sua subunidade α . Esta subunidade irá estimular a adenilato ciclase a ativar também a enzima adenilciclase (proteína integral da membrana plasmática) que catalisa ATP para produzir cAMP. Quando a cAMP é formada, esta estimula a proteína quinase (PKA) a catalisar a fosforilação de alguma enzima-alvo ou de fatores de transcrição. No caso dos lipídios, a PKA fosforila a triacilglicerol lipase, que causará lise dos triglicerídeos liberando ácidos

graxos e formando glicerol (NELSON e COX, 2002; FAHERTY et al, 2007; CAMPBELL e FARREL, 2008).

A enzima adenilato ciclase é composta por três proteínas básicas: uma subunidade catalítica (enzimática), que converte o substrato ATP em cAMP; um nucleotídeo guanina, ligada a uma proteína a qual medeia a ativação hormonal; e um receptor hormonal (RODBELL, 1980; LAFONTAN e BERLAN, 1993). A regulação fisiológica dessa enzima e dos níveis intracelulares de cAMP, ocorre primeiramente pela interação iniciada por hormônios ligados ao receptor, a qual é mediada por uma guanina (SEAMON e DALY, 1981). O forskolin, sendo um ativador da adenilato ciclase, atua rapidamente e reversivelmente direto na subunidade catalítica da adenilato ciclase, sem a necessidade da presença da guanina (SEAMON et al., 1981; SEAMON e DALY, 1981).

Com o uso do forskolin a atividade lipolítica dos embriões bovinos PIV foi significativamente aumentada. Este fato indica que seu uso durante o cultivo de embriões PIV pode resultar na produção de embriões com conteúdo lipídico semelhante ao observado em embriões produzidos *in vivo*, o que melhora sua qualidade quando cultivados sob condições favoráveis (MEN et al., 2006; PASCHOAL, 2009).

Entretanto, o mecanismo específico que origina o aumento do acúmulo lipídico em embriões PIV na presença de SFB ainda não foi totalmente definido (ABE et al., 2002).

5 Vitrificação de Embriões Bovinos Produzidos *in vitro* (PIV)

Apesar do grande número de embriões frescos transferidos, o uso de embriões criopreservados é extremamente limitado. A criopreservação de embriões é uma tecnologia reprodutiva assistida que permite estocagem de embriões em excesso derivados de sistemas de PIV e de TE, então eles poderão ser comercializados ou estocados até o momento mais conveniente. Considera-se a criopreservação, como uma estratégia para ultrapassar alguns problemas logísticos, como exemplo, para expandir a comercialização de embriões entre países. No entanto, os resultados de criopreservação de embriões PIV limitam a sua aplicação no manejo reprodutivo a campo (BEEBE et al, 2005; GEORGE et al, 2008; SUDANO et al., 2013).

Desde o primeiro sucesso da criopreservação em embriões de camundongos (WHITTIGNHAM et al., 1972), vários procedimentos foram desenvolvidos para

criopreservar, podendo ser classificados em dois métodos principais: congelamento lento e vitrificação. Apesar de ambos serem considerados uma técnica de criopreservação, eles possuem diferenças conceituais importantes. Enquanto no congelamento lento a água extracelular cristaliza, ou seja, ocorre a formação de gelo; na vitrificação tanto a solução intra- como extracelular vitrifica após ocorrer a desidratação celular (SARAGUSTY e ARAV, 2011).

A vitrificação tem sido considerada uma alternativa para a congelação lenta, podendo ser utilizada rotineiramente tanto nos laboratórios de pesquisa como em fazendas (CAMPOS-CHILLÒN et al., 2006), pois apresenta execução simples e é menos onerosa que a congelação (SHAW et al., 1997; PTAK et al., 1999).

A partir de trabalhos anteriores (NAGASHIMA et al., 1994; MEN et al., 2006; SOMFAI et al., 2009; MEN et al., 2011) verificou-se que a vitrificação vem ganhando um papel importante com embriões PIV, mas sua eficiência com os mesmos ainda encontra-se preocupante (CUELLO et al., 2013). Uma das grandes limitações da PIV de embriões consiste na necessidade de um grande número de embriões transferidos para obter uma prole equivalente aos processos produzidos *in vivo* (CUELLO et al., 2013). Para aumentar a sobrevivência de embriões PIV após a criopreservação é necessário não somente o aperfeiçoamento da técnica de PIV, mas também das técnicas de criopreservação (SOMMERFELD e NIEMANN, 1999).

O estágio do embrião influencia diretamente na taxa de eclosão após aquecimento, sendo os blastocistos expandidos (Bx) mais resistentes aos processos de vitrificação e aquecimento que os blastocistos (Bl). E esse fator independe do protocolo de vitrificação ou do volume da solução (RIOS et al., 2010).

De qualquer forma, após a criopreservação os blastocistos passam por uma reorganização celular, principalmente seu citoesqueleto, o qual pode sofrer desarranjo pela presença do crioprotetor ou mesmo destruído pelo próprio processo de criopreservação (DOBRINSKY, 1996). As membranas celulares também sofrem várias injúrias durante esses processos (WOLFE e BRYANT, 1999) que irão influenciar diretamente na sobrevivência embrionária (RIOS et al., 2010).

Pode-se dizer que a presença de SFB prejudique os mecanismos celulares responsáveis pelo reparo dessa membrana plasmática após a criopreservação, podendo ocorrer uma incorporação de ácidos graxos saturados na membrana, induzindo provavelmente a mudanças na composição desta estrutura, fazendo ela se tornar mais rígida, e incapaz de resistir à criopreservação (MUCCI et al., 2006).

Segundo Hasler et al. (1997), a sobrevivência dos embriões PIV, bem como sua qualidade após criopreservação, não são afetadas somente pela grande quantidade de lipídios, mas também pela qualidade e idade do embrião, estágio de desenvolvimento embrionário, crioprotetor, pH do meio de criopreservação, método de criopreservação e sistema de cultivo no qual os embriões são produzidos.

No entanto, até o momento, a principal causa na diminuição da qualidade em embriões PIV após a criopreservação ainda prevalece a hipótese da suplementação do meio de cultivo com SFB (ABE et al., 2002; MUCCI et al., 2006; BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL, 2007). E apesar do efeito benéfico do SFB durante a PIV a utilização de meios de cultivos, na ausência destas proteínas aumentou significativamente a criotolerância embrionária alcançando um nível de qualidade semelhante a de blastocistos produzidos *in vivo* (RIZOS et al., 2003).

5.1 Características e composição dos meios de vitrificação

A vitrificação de embriões consiste num método simples por meio do qual toda a solução que possui a amostra vitrifica completamente (RIOS et al., 2010). Os principais fatores de impacto em determinar a sobrevivência embrionária após vitrificação e aquecimento são a taxa de resfriamento (WOLFE e BRYANT, 2001), a viscosidade da solução e o volume da amostra (ARAV et al., 2002).

Durante a vitrificação a velocidade de criopreservação deve ser alta, permitindo a imersão direta da solução no N₂ líquido a partir da temperatura ambiente (GONÇALVES et al., 2002). Desta forma, em comparação com a congelação, a vitrificação pode ser realizada na ausência do aparelho de congelação, em menor tempo e levando a ausência da formação de cristais de gelo intracelulares, os quais são os principais causadores das crioinjúrias celulares (OKADA et al, 2002).

Algumas estratégias sobre vitrificação e aquecimento são implantadas para melhorar a sobrevivência, tal como transferir o embrião em pequenos volumes de meio para facilitar o contato com o N₂ líquido e alcançar um estado vítreo. Além do mais, reduzindo as concentrações dos crioprotetores, haverá menos probabilidade de toxicidade embrionária (RIOS et al., 2010). Diminuindo o volume do crioprotetor, minimiza a probabilidade de aparecimento de fragmentos vítreo do meio, os quais normalmente aparecem quando o volume é superior a 1 µL (wass et al., 2002).

Foi determinado utilizar pequeno volume de meio, pois assim ocorre um íntimo contato com o N₂ líquido obtendo uma rápida taxa de resfriamento para alcançar o estado vítreo. Assim também se permite usar menos concentrações dos crioprotetores com consequente redução da toxicidade do embrião (RIOS et al., 2010). A partir disso foram desenvolvidos métodos de palhetas como a *open pulled straws* (OPS) (VAJA et al., 1998) e a micropipeta de vidro (GMP) (CHO et al., 2002), as quais permitem utilizar um pequeno volume do crioprotetor e assim aumentar a taxa de refrigeração. Entretanto essas palhetas possuem desvantagens, por serem feitas manualmente podem variar em seu diâmetro, ou por serem de vidro podem facilmente quebrar – danos os quais levam a grandes perdas nos processos de vitrificação e consequentemente dos embriões (RIOS et al., 2010).

Quando os embriões são vitrificados, a formação de cristais de gelo é prevenida devido à presença de altas concentrações de crioprotetores (CHO et al., 2002). A exposição dos embriões a altas concentrações de crioprotetores leva a um aumento da viscosidade dos meios intra- e extracelulares, possibilitando uma refrigeração rápida e induzindo a mudança do estado líquido para o vitrificado, sem a formação de cristais de gelo (OHBOSHI, 1998). Além disso, a utilização das altas concentrações de crioprotetor também pode evitar fraturas da ZP.

Durante a vitrificação, as altas concentrações de crioprotetores aumentam os danos osmóticos e tóxicos. Desta forma, uma estratégia para evitar essa toxicidade consiste em diminuir o tempo de exposição dos embriões à solução (GONÇALVES et al., 2002). No entanto, se essa exposição for muito curta, a penetração do crioprotetor não será suficiente, e o gelo intracelular poderá ser formado mesmo quando o gelo extracelular estiver ausente. Portanto, um tempo de exposição ótimo para o sucesso da vitrificação deve ser um meio termo entre a prevenção das injúrias tóxicas e prevenção da formação de gelo intracelular (KASAI, 1996).

As soluções de criopreservação contêm um ou mais tipos de crioprotetor, vários sais e uma ou mais macromoléculas. De acordo com suas propriedades de difusão através das membranas biológicas, os crioprotetores podem ser divididos em duas categorias: intracelulares: que são solutos orgânicos responsáveis por proteger as organelas das células durante a criopreservação (glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), metanol, etanol, etileno glicol (EG), 1,2 propanodiol, etc) e extracelulares: que são as macromoléculas e açúcares cuja função é reduzir a formação de gelo, facilitar a

desidratação das células e proteger a membrana celular durante o aquecimento (glicose, lactose, sacarose, polivinilpirrolidona (PVP), etc) (NIEMANN, 1991).

No caso da vitrificação as macromoléculas parecem ser especialmente importantes, uma vez que nestas soluções a concentração de crioprotetor é muito alta e as macromoléculas modificam o crioprotetor durante o processo de vitrificação. Por exemplo, a adição de polietileno glicol aumenta a viscosidade de soluções de vitrificação contendo EG (O'NEIL et al., 1997).

Outras macromoléculas comumente utilizadas são o ficoll, o PVP e o dextran. O ficoll 70 consiste no principal componente associado ao EG (KASAI et al., 1996). A adição de macromoléculas como o ficoll 70 promove a vitrificação pelo aumento da tensão de superfície da solução protegendo as membranas celulares, e abaixando a quantidade de EG necessária para a vitrificação da solução (SHAW et al., 1997).

O EG resulta em um menor efeito deletério sobre o desenvolvimento embrionário, bem como preservação da integridade de membrana e da estrutura do citoesqueleto (HOTAMISLIGIL et al., 1996). Além disso, o EG resultou em taxas mais altas de preservação de blastocistos quando comparado com sua associação ao DMSO (CAMPOS-CHILLÓN et al., 2009). Frente a estes resultados o EG tem sido considerado o melhor candidato para a vitrificação e o glicerol permanece como segunda escolha.

A adição de carboidratos ao meio de vitrificação auxilia na desidratação e re-hidratação dos embriões. Isso sugere que os açúcares são capazes de preservar a integridade estrutural e funcional das membranas (HOTAMISLIGIL et al., 1996). Os açúcares contribuem para a vitrificação funcionando como crioprotetores não permeáveis (KULESHOVA et al., 1999). A sacarose consiste num agente crioprotetor não permeável a qual exerce um efeito osmótico significativo, sendo empregada tanto na desidratação como na re-hidratação após o aquecimento. Diversas observações confirmam o efeito estabilizante da adição de sacarose na solução de vitrificação (SZELL e SHELTON, 1986; TODOROV et al., 1993; RAYOS et al., 1994).

A vitrificação utilizando palhetas de 0,25 mL vem oferecendo vantagens para a biotecnologia de embriões quando aplicada a campo, justamente pelo aumento da sobrevivência do embrião e pela redução do custo da transferência embrionária (GUIGNOT et al., 2006). O uso dessa técnica utilizando-se o EG ou 1,2 propileno glicol, tem levado a obtenção de resultados animadores, pois esses crioprotetores

penetram na célula muito rápido e causam um menor choque osmótico (PALASZ e MAPLETOFT, 1996).

Okada et al. (2002) observaram que os embriões após vitrificação em palhetas francesas mantiveram sua morfologia semelhante àqueles não vitrificados, apresentando poucas lesões em seu citoplasma e na membrana celular. Campos-Chillòn et al. (2006), também relataram que a vitrificação de embriões utilizando-se de palhetas francesas consiste num ótimo protocolo com pouca influencia sobre a viabilidade embrionária.

Assim, os protocolos de vitrificação de embriões bovinos utilizando-se palhetas francesas são mais simples, por não apresentar a necessidade de modificação das palhetas e por não entrarem em contato direto com o N₂ líquido (CAMPOS-CHILLÒN et al., 2006) como ocorrem com as demais técnicas (VAJTA et al., 1998; CHO et al., 2002).

6 Apoptose Celular

Existem dois processos distintos de morte celular, a necrose e a apoptose. A necrose é o resultado de uma injúria que afeta um grande grupo de células, causando edema celular e ruptura de membrana que provoca uma resposta inflamatória em tecidos sadios adjacentes. Em contraste, a apoptose afeta células isoladas, não compromete tecidos próximos e não possui uma resposta inflamatória associada (HARDY, 1999). Trata-se de uma forma fisiológica normal de morte celular, que ao contrário da necrose, se caracteriza por um processo ativo de alterações morfológicas e fisiológicas. A apoptose também é conhecida por morte programada porque envolve a ativação de um programa genético para o desmantelamento da célula. Desta forma, as células sofrem um constante processo de renovação, mantendo o número de células estável, graças ao equilíbrio existente entre a contínua proliferação e apoptose celular (JORDÃO e ANDRADE, 2000).

Uma série de fases consecutivas, morfollogicamente distintas, está envolvida no processo de apoptose. Inicialmente a cromatina se agrega em uma grande massa compacta granular, o citoplasma condensa e as membranas nuclear e citoplasmática se deformam (HARDY, 1999). Posteriormente o núcleo sofre fragmentação e ocorre a formação de vesículas na membrana celular, compostas por fragmentos nucleares e algumas organelas, denominadas corpúsculos apoptóticos (BETTS e KING, 2001).

As caspases são proteases provedoras da apoptose, que induzem mudanças no transporte de elétrons, perda do potencial de membrana mitocondrial e alteração no estado de redução-oxidação celular. Além disso, a caspase 3 lisa o citoesqueleto celular levando as desestruturação celular (GREEN e REED, 1998; PARONE, 2002). A membrana mitocondrial também diminui seu potencial e sem um mecanismo funcional para produzir energia, o oócito ou o embrião passará por morte celular devido ao esgotamento dos estoques de energia (KRISHER, 2004).

A apoptose é desencadeada por fatores que levam a ativação de receptores de membrana chamados “receptores de morte”, os quais recrutam a caspase 8 presente no citosol ativando a proteína pró-apoptótica Bid, da família bcl-2, a qual ativa a caspase 3 que induz a quebra de diversas proteínas (SHARMA, 2000). Esta cascata de reações induz, na mitocôndria, a liberação do citocromo c. As proteínas da família bcl-2 estão diretamente envolvidas no controle da apoptose. Algumas destas proteínas são anti-apoptóticas (bcl-2 e bcl-XL) enquanto outras são pró-apoptóticas (Bad, Bax e Bid). A sensibilidade das células ao estímulo indutor da apoptose depende do balanço entre estas proteínas. Quando existe um excesso de proteínas pró-apoptóticas a célula fica mais sensível a apoptose, e quando existe um excesso de proteínas anti-apoptóticas a célula fica mais resistente (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2000).

As proteínas pró-apoptóticas são frequentemente encontradas no citosol, onde atuam como sensores de danos ou estresse celular. Após o estímulo estressante, estas proteínas são re-aloçadas na superfície da mitocôndria, onde existem proteínas anti-apoptóticas. Esta interação entre as proteínas pró- e anti-apoptóticas desfaz a função normal das proteínas anti-apoptóticas e leva a formação de poros na membrana mitocondrial, por onde sai o citocromo c e outras moléculas pró-apoptóticas. Este processo leva então, a ativação da cascata de caspases (GREEN e REED, 1998; PARONE, 2002).

O processo normal de maturação poderá ser interferido com um nível de Ca^{2+} intracelular elevado, com estresse celular ou uma alta concentração de Ca^{2+} extracelular. Sob condições fisiológicas, o trânsito de Ca^{2+} serve como um segundo mensageiro nas células mamíferas e estimula o metabolismo da oxidação mitocondrial e a produção de ATP.

O excesso de Ca^{2+} abre os poros (KRIEGER e DUCHEN, 2002), resultando na liberação do citocromo c e ativação da caspase proteolítica que causa morte celular por apoptose. Esses poros são responsáveis para a permeabilidade transitória da membrana mitocondrial, a qual consiste num ponto crítico para a apoptose. A formação dos poros

pode levar ao inchamento mitocondrial e morte celular. Acredita-se que uma abertura desses poros é uma consequência da apoptose e não a causa dela (KINNALLY e ANTONSSON, 2007).

As mitocôndrias são a maior fonte de ROS, o que pode causar danos oxidativos a elas mesmas (TAKAHASHI et al., 2004). O poro aberto é um resultado de uma sobrecarga de Ca^{2+} e formação de ROS (MATHER e HAGAI ROTTENBEG, 2000) e uma sobrecarga do Ca^{2+} pode aumentar essa produção de ROS na mitocôndria (GRIJALBA et al., 1999). Uma produção excessiva de ROS em células também provoca a abertura desses poros. Da mesma forma a abertura desse poro liberará o citocromo c, que ativar a cascata de caspase e induzirá a apoptose celular (THOUAS et al., 2004).

A produção excessiva de ROS, a sobrecarga de Ca^{2+} , ou a expressão das proteínas da família bcl-2 podem levar a formação dos poros, seguida da liberação do citocromo c e ativação da cascata de caspase (WANG et al., 2009). Pode ser que o poro seja aberto como um mecanismo de proteção contra a sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial (CROMPTON, 1999).

A comunicação entre o oócito e suas células do *cumulus* é tão importante para o desenvolvimento oocitário quanto para o sucesso da MIV e FIV (MERMILLOD et al., 2008). As células do *cumulus* são responsáveis pelo suprimento nutricional para o oócito na fase final de sua maturação (GILCHRIST et al., 2008).

A redistribuição mitocondrial e sua atividade oxidativa são essenciais para o desencadeamento da apoptose nas células do *cumulus* durante a maturação (TORNER et al., 2004). A distribuição das mitocôndrias de forma delgada e homogênea está correlacionada com uma baixa atividade oxidativa e com baixo nível de apoptose nas células do *cumulus*, enquanto que uma distribuição homogênea, mas granulada indica uma alta atividade oxidativa e alto nível de apoptose celular no *cumulus* (WANG et al., 2009). É provável que os oócitos transportem moléculas pró-apoptóticas do ooplasma mitocondrial para as células do *cumulus*, sendo os fatores parácrinos e as junções Gap as vias de comunicações entre ambos (ANDREUCCETTI et al., 1999; ALBERTINI et al., 2001).

A maioria dos embriões no período de pré-implantação possuem células normais e anormais e a apoptose elimina as células nocivas para o desenvolvimento progredir, embora uma ativação anormal nos processos de morte programada nesta fase interferir-se-á em toda a vida embrionária (GJORRET et al., 2003).

A apoptose não ocorre antes da compactação embrionária, ou seja, durante a fase que ocorre o início do estágio de diferenciação celular (BYRNE et al., 1999; GJORRET et al., 2003). Pode ser que o embrião induza competência aos processos de apoptose ative genes que supram o processo no desenvolvimento embrionário. Essa resistência pode ser adquirida pela presença de inibidores herdados maternalmente, pelos baixos níveis de caspase ou citocromo c por imaturidade mitocondrial, ou ainda pelos baixos níveis de transcritos responsáveis pelo processo de morte durante as primeiras fases do desenvolvimento (BETTS e KING, 2001) Entretanto após a passagem pelo 4º ciclo celular – período de ativação do genoma embrionário (embrião com 16 – 32 células) – ocorre uma grande perda embrionária provavelmente ligada a morte celular programada (MEIRELLES et al., 2004).

Capítulo 2

Trabalho a ser enviado para a revista “Reproduction in Domestic Animals”

(Anexo 1)

Produção *in vitro* de embriões bovinos após o bloqueio da maturação oocitária com diferentes concentrações de forskolin

DM Paschoal^{1*}, RRD Maziero¹, MJ Sudano¹, MD Guastali¹, LE Vergara¹, LF Crocomo¹, JF Lima-Neto¹, LCO Magalhães¹, BA Monteiro¹, T S Rascado¹, A Martins Jr.², FC Landim-Alvarenga¹

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil.

²Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, Brasil.

*Autor para correspondência:

Daniela Martins Paschoal

Endereço: Rubião Jr. s/n, CEP: 18618-970, Botucatu/SP, Brasil

Universidade Estadual Paulista, UNESP/FMVZ, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

Fone/Fax: +55 14 3880 2119

e-mail: dmpaschoal@yahoo.com.br

Resumo

A inibição da maturação nuclear permite um maior tempo para o oócito acumular as moléculas importantes para o desenvolvimento embrionário. Sendo assim, este trabalho possui o objetivo de avaliar o bloqueio da meiose oocitária a partir da adição do forskolin, um eficiente inibidor da maturação nuclear em oócitos, ao meio de maturação *in vitro* (MIV). O forskolin foi adicionado ao meio de MIV por 6 horas, nas concentrações de 0,1 mM; 0,05 mM; 0,025 mM e em seguida esses oócitos foram maturados em meio livre da droga por 18 horas. Com os oócitos foi avaliado o estágio de maturação nuclear, a atividade e a distribuição mitocondrial, a ultraestrutura, o número de células íntegras e a taxa de apoptose. Após os oócitos foram fertilizados e cultivados *in vitro* durante sete dias. No D 7 foi avaliada a taxa de blastocistos, a ultraestrutura, o número de células íntegras e a taxa de apoptose. O tratamento com forskolin por 6 horas não resultou em atraso na retomada da meiose em relação ao controle. Entretanto, após a retirada do bloqueio e maturação por 18 horas um maior número de oócitos tratados com 0,1 mM de forskolin se encontrou em M I ($P<0,05$). Não houve diferença com relação a atividade e distribuição mitocondrial nos oócitos, no entanto a maior concentração da droga levou a alterações ultraestruturais nos oócitos, com excesso de metabolização lipídica e desorganização do citoesqueleto. Apesar disso, não se observou diferença na taxa de produção de blastocistos avaliados no D 7, bem como no número total de células íntegras dos embriões. Mas observou-se uma maior taxa de apoptose no grupo de blastocistos produzidos a partir de oócitos bloqueados com a maior concentração de forskolin ($P<0,05$). Conclui-se que o forskolin, utilizado isoladamente, não foi eficiente em bloquear a M II. A maior concentração do agente causou um alto índice de apoptose celular, sendo confirmado pela análise ultraestrutural, entretanto sem prejudicar a PIV de embriões.

Palavras-chave: apoptose, cAMP, forskolin, meiose, MIV, oócito.

Introdução

Apesar dos avanços ocorridos na PIV, a eficiência da maturação *in vitro* (MIV) ainda encontra-se inferior à maturação *in vivo*, o que limita sua aplicação nas técnicas de reprodução assistida (Gilchrist, 2011). O processo de maturação inclui todos os eventos que permitem ao oócito expressar seu potencial máximo de desenvolvimento após a fecundação. Neste sentido, a maturação é uma das fases mais importantes da PIV de embriões, pois é nesse período que o oócito adquire capacidade para prosseguir para os próximos eventos (Gottardi e Mingoti, 2009).

Embora os oócitos imaturos de mamíferos possam retomar a meiose após o isolamento de seus folículos antrais (Edwards et al., 1965), nestas condições a maturação citoplasmática pode acontecer de forma assincrônica em relação a nuclear (Janssenswillen et al., 1995; Huang et al., 1999). É necessário então, submeter o oócito à um tempo maior de maturação citoplasmática para que ele possa adquirir uma maior competência para o desenvolvimento *in vitro* (Wu et al., 2006). Para isso, foi sugerido que a inibição ou o atraso espontâneo da maturação nuclear *in vitro* permitiria um maior tempo para o oócito acumular as moléculas importantes para o desenvolvimento embrionário (Bilodeau-Goeseels, 2012).

O atraso da meiose pode ser obtido incubando-se os complexos *cumulus oophorus* (CCOs) ainda imaturos com agentes inibidores, sendo a maturação iniciada logo após a remoção dos inibidores (Gilchrist e Thompson, 2007). O tratamento com agentes que elevam a adenosina monofosfato cíclica (cAMP) levaram a resultados que comprovam a participação deste composto no processo de bloqueio da maturação nuclear (Bilodeau et al., 1993; Gilchrist e Thompson, 2007).

A cAMP, derivada das células do *cumulus*, é transferida através dos prolongamentos intracelulares que penetram a zona pelúcida até o ooplasma, consistindo em uma molécula reguladora da maturação nuclear. Portanto, um desarranjo do metabolismo funcional da comunicação entre oócitos e células do *cumulus* resultou na redução da cAMP intra-oocitária com consequente reinício da meiose (Racowsky, 1984). Sendo assim, o forskolin consiste em um eficiente inibidor da maturação nuclear em oócitos por estimular a cAMP (Racowsky, 1984; Sirard e First, 1988; Sirard, 1990; Bilodeau et al., 1993).

Por sua vez, a maturação citoplasmática é caracterizada por diversas mudanças no formato e localização das organelas celulares. Estas estão intimamente relacionadas com a aquisição da competência meiótica e com a capacidade do oócito ser fecundado e de passar pelo desenvolvimento embrionário (Hyttel et al., 1989).

Dentre as organelas citoplasmáticas, as mitocôndrias entram como um papel fundamental na maturação citoplasmática, por possuírem grande importância no metabolismo oocitário, responsável por suprir a energia que é consumida durante a maturação. A migração das mitocôndrias para as áreas de alto consumo de energia é crucial para os oócitos e para os blastômeros do embrião durante períodos críticos do ciclo celular. Essas organelas sintetizam a adenosina trifosfato (ATP) necessária para a síntese de proteínas, as quais suportam a finalização dos processos subsequentes de maturação e do desenvolvimento embrionário (Krisher e Bavister, 1998; Stojkovic et al., 2001). Sendo assim, as mitocôndrias têm sido um parâmetro importante para acessar o potencial de competência do oócito e do embrião (Tarazona et al., 2006) pois a partir de suas distribuições e atividade funcional pode-se estimar a maturação citoplasmática (Torner et al., 2004).

Esse trabalho teve o objetivo de avaliar o bloqueio da meiose oocitária a partir da adição de diferentes concentrações de forskolin ao meio de MIV, por meio da avaliação da atividade e distribuição mitocondrial, organização ultraestrutural, bem como formação de embriões, número total de células íntegras e avaliação do índice de apoptose nos blastocistos.

Materiais e Métodos

Todas as substâncias que foram utilizadas neste trabalho foram adquiridos da Sigma (Sigma-Aldrich[®], Corporation, St. Louis, MO), exceto para aquelas que são especificadas no texto.

Coleta dos ovários e maturação *in vitro* (MIV)

Foram utilizados ovários de vacas Zebuínas de abatedouro comercial, transportados ao laboratório da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP/Botucatu. No laboratório, os ovários foram lavados com NaCl a 0,9% a uma temperatura de 37 a 38°C. Foram aspirados folículos com diâmetro entre 2 a 8 mm com seringas de 10 mL e agulhas 40 x 12.

Após a seleção, os oócitos (n = 584) foram lavados e transferidos para gotas de maturação *in vitro* (MIV) em Tissue Culture Medium – 199 (TCM 199[®], Gibco 11150-059, Grand Island, NY, USA) acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB[®], Gibco 12657-029, Grand Island, NY, USA), 0,011 g/mL de Piruvato de Sódio, 1 µg/µL de Hormônio Folículo Estimulante (FSH, Pluset[®], Hertape), 5 µg/µL de Hormônio Luteinizante (LH, Lutropin[®], Bioniche) e 16,6 µg/µL de Amicacina. Os oócitos permaneceram em estufa com 5% de CO₂ em ar sob temperatura de 38,5°C e umidade absoluta.

Os oócitos permaneceram em meio de MIV em 3 diferentes concentrações do Forskolin[®] (F-6886): 0,1mM; 0,05mM; 0,025mM durante 6 horas. Em seguida, foram maturados por mais 18 horas em meio livre do Forskolin, totalizando em 24 horas de maturação.

Desta forma os grupos experimentais foram divididos conforme a adição das três concentrações do forskolin sob dois períodos de tempo: 6 e 24 horas.

Grupo de oócitos com 6 horas: esse grupo avaliou somente o efeito bloqueador do forskolin no oócito num período de 6 horas.

Controle 6 horas: oócitos que foram maturados durante 6 horas na ausência do forskolin.

F 0,025 mM – Bloq: oócitos que foram maturados durante 6 horas com a concentração de 0,025 mM de forskolin.

F 0,05 mM – Bloq: oócitos que foram maturados durante 6 horas com a concentração de 0,05 mM de forskolin.

F 0,1 mM – Bloq: oócitos que foram maturados durante 6 horas com a concentração de 0,1 mM de forskolin.

Grupo de oócitos com 24 horas: esse grupo avaliou o efeito bloqueador do forskolin num período de 6 horas, seguido da reversão meiótica durante 18 horas no oócito.

Controle: oócitos que foram maturados durante 24 horas na ausência do forskolin.

F 0,025 mM – Bloq/Rev: oócitos que foram maturados durante 6 horas com a concentração de 0,025 mM de forskolin, seguido da maturação por 18 horas na ausência de forskolin.

F 0,05 mM – Bloq/Rev: oócitos que foram maturados durante 6 horas com a concentração de 0,05 mM de forskolin, seguido da maturação por 18 horas na ausência de forskolin.

F 0,1 mM – Bloq/Rev: oócitos que foram maturados durante 6 horas com a concentração de 0,1 mM de forskolin, seguido da maturação por 18 horas na ausência de forskolin.

Avaliação do estágio de maturação nuclear

De cada grupo experimental foram retirados aleatoriamente oócitos com 0 (Imaturos), 6 e 24 horas de maturação ($n = 712$). As estruturas foram retiradas do meio MIV e transferidas ao meio TCM 199 Hepes[®] (Gibco 12340-03) com Hyaluronidase Tipo II para o desnudamento. Os oócitos foram então transferidos para uma gota de 5 μ L de Hoechst 33342 (concentração de 0,01 mg/mL) em uma lâmina e cobertos com lamínula. Após 20 minutos a morfologia nuclear foi observada em microscópio invertido com luz fluorescente ultra-violeta (Leica DMIRB) classificando-se o núcleo em Vesícula Germinativa (VG), Quebra da Vesícula Germinativa (QVG), Metáfase I (M I), Metáfase II (M II) e Degenerado ou Não Identificado (D/NI) (onda de excitação: 350 nm e onda de emissão: 461 nm) (Figura 1).

Avaliação da atividade e distribuição mitocondrial

Para avaliação da maturação citoplasmática, os oócitos em estágio de M II ($n = 10$ por grupo) foram corados com o MitoTracker[®] Orange CMTMRos (Invitrogen, Molecular Probes, M7510), para assim as mitocôndrias serem visualizadas. Os oócitos foram lavados 3 vezes em PBS com 3% de BSA e incubados durante 30 minutos no mesmo meio contendo 280 nM de MitoTracker[®] Orange CMTMRos numa temperatura

de 38°C sob 5% de CO₂ em ar. Após a incubação, os oócitos foram lavados 3 vezes em PBS sem BSA pré-aquecido. Posteriormente foram corados com 2,5 µg/mL de Hoechst 33342 em 3:1 (v/v) glicerol/PBS. A avaliação foi feita em microscópio invertido a Laser Confocal da marca Leica TCS SP 5 (onda de excitação: 554 nm e onda de emissão: 576 nm) (Figura 2).

Avaliação da ultraestrutura oocitária

Foram utilizados de 5 a 10 oócitos e embriões de cada grupo experimental.

Os oócitos e os embriões foram fixados por no mínimo 24 horas em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1 M, com pH = 7,4. Durante o tempo de fixação estes foram incluídos em Agar a 2% o qual foi corado com azul de metileno para facilitar sua visualização. Após a lavagem, no mesmo tampão, os oócitos/embriões foram submetidos a pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% durante 3 horas a temperatura de 4°C. Foram então, lavados por 3 vezes em água bidestilada e iniciou-se a desidratação em séries crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) durante 5 minutos cada, repetindo-se a lavagem na concentração 100% por 3 vezes. A polimerização foi feita com Araldite 502 durante 72 horas a temperatura de 60°C.

Para localização dos oócitos/embriões e seleção de campos significativos para os estudos ultraestruturais, foram obtidas secções semi-finas (0,5 µm) primeiramente com navalha de vidro em ultramicrotomo. Os cortes ultra-finos foram obtidos com navalha de diamante e colhidos em grades de cobre, corados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados ao microscópio eletrônico de transmissão modelo Tecnai Spirit da marca Fei Company.

Fertilização *in vitro* (FIV)

Oócitos maturados de todos os grupos foram fertilizados *in vitro* (D 0 = FIV) com sêmen congelado de touro da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). O sêmen foi selecionado pelo método Percoll (Parrish et al., 1995), sendo a concentração final ajustada para 2×10^6 espermatozóides /mL. Os oócitos foram incubados durante 24 horas, em estufa com 5% de CO₂ em ar, sob temperatura de 38,5°C e umidade absoluta.

Os oócitos foram fertilizados em Human Tubal Fluid (HTF[®], Irvine Scientific, Santa Ana, California, USA) acrescido de 5 mg/mL de Albumina Sérica Bovina (BSA, A-8806), 0,011 g/mL de Piruvato de Sódio, 0,5 mg/mL de Cafeína, 0,003 g/mL de Heparina, de 0,0003 g/mL de Penicilinamina, 0,00011 g/mL de Hipotaurina e 0,00018 g/mL de Epinefrina e 16,6 µg/µL de Amicacina.

Cultivo *in vitro* (CIV)

Os prováveis zigotos foram cultivados em meio Synthetic Oviductal Fluid (SOFaa – Holm et al., 1999) mais 2,7 mM de Mio-inositol, 0,2 mM de Piruvato de Sódio, 5 mg/mL de BSA (A-8806), 2,5% SFB e 16,6 µg/µL de Amicacina. Os embriões foram mantidos em estufa com 5% de CO₂, 5% de O₂, e 90% de N₂, sob temperatura de 38,5°C e umidade absoluta. No D 7 (D 0 = FIV) foi verificada a taxa de formação de blastocisto.

Avaliação do índice de apoptose

Foi avaliado o índice de apoptose após 7 dias de CIV (D 0 = FIV). Foram utilizados de 10 a 15 embriões de cada grupo experimental pela técnica TUNEL[®] (Terminal deoxinucleotil transferase Uracil Nick End Labeling) que identifica *in situ*, a fragmentação internucleossômica do DNA, evento este resultante da apoptose. Esta

avaliação foi realizada com o “*Kit in Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein*” (Roche® - 11 684 795 910, Mannheim, Alemanha).

Os embriões foram lavados em solução de lavagem (0,1% PVP/PBS) e fixados em solução fixadora (paraformaldeído a 4%) por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente foram permeabilizados em solução permeabilizadora (0,1% de triton X-100 e 0,1% citrato de sódio em PBS) por 1 hora em câmara úmida e temperatura ambiente. Os embriões foram incubados no controle positivo e negativo com a solução de DNAase (Promega, M 6101, Madison, EUA) por 1 hora à 37°C (estufa) no escuro.

Após, o controle positivo e as amostras foram incubadas em gotas de 10 µL do MIX TUNEL em lâminas com coroa de esmalte por 1 hora a temperatura de 37°C no escuro e em câmara úmida. O controle negativo foi incubado apenas com solução marcadora na ausência da solução enzimática para conferir a marcação.

Após serem lavados em solução de lavagem, controles e amostras foram submetidos a um contraste para visualização do DNA com solução de Hoechst 33342 (1 mg/mL) e glicerol em uma lâmina com lamínula e foram analisados em microscópio de fluorescência invertido. Com filtro de excitação de 450-490 nm e de emissão de 515 nm os núcleos fluorescentes em verde (isotiocianato de fluoresceína - FITC) foram considerados as células TUNEL positivas, ou seja, apresentaram o DNA fragmentado. Com filtro de excitação de 365 nm e de emissão de 420 nm os núcleos fluorescentes em azul (Hoechst 333342) indicaram a presença e a localização do núcleo das células.

Para a contagem do número de células apoptóticas (coradas em verde) e número total de células (coloração azul) foi utilizado o programa Image J 1.41 (Wayne Rasband National Institutes of Health, Bethesda, EUA). Com base nestes dados, foi feito o cálculo da porcentagem de ocorrência da apoptose (número de células apoptóticas em relação ao número total de células do embrião).

Análise Estatística

Para análise estatística, os dados foram analisados utilizando a ANOVA através do PROC GLM do SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Fontes de variação no modelo incluindo tratamento e réplica foram considerados como efeito fixo e aleatório, respectivamente. Se a ANOVA foi significativa, os contrastes das médias foram realizados utilizando a diferença dos quadrados mínimos. Os dados são apresentados como média dos quadrados mínimos e erro padrão. Para todas as análises foi adotado o nível de significância de 5%.

Resultados

Não houve diferença com relação ao estágio de desenvolvimento nuclear entre os grupos controle e tratamentos quando os oócitos foram cultivados por 6 horas com as 3 concentrações de forskolin (Tabela 1). Quando esses oócitos foram cultivados por 6 horas com as diferentes concentrações de forskolin e posteriormente por 18 horas na ausência desse agente, foi observada diferença estatística no estágio de M I entre os grupos controle e o que usou a maior concentração de forskolin ($P < 0,05$ – Tabela 2).

Não houve diferença com relação a atividade mitocondrial, nem com a distribuição heterogênea das mitocôndrias pelo citoplasma de oócitos em M II entre os grupos, indicando que independente da dose do forskolin a atividade mitocondrial se manteve estável (Tabela 3).

A partir da análise ultraestrutural foi observado que o grupo de oócitos avaliados imediatamente após a aspiração (grupo Imaturo - 0 hora) apresentou células da granulosa mais compactas (Figura 3 A). Os grânulos corticais estavam localizados na região central do ooplasma em forma de cluster (Figura 3 B). Foi observada a presença de projeções das células do *cumulus* (PCCs) transpassando pela zona pelúcida (Figura 3

D). Além do mais, esse grupo de oócitos se caracterizou com um espaço perivitelínico maior que o grupo maduro (Controle – Figura 3 B, C e D).

Os oócitos que foram maturados por 24 horas (grupo Controle) apresentaram as células da granulosa bem expandida (Figura 4 A), com grânulos corticais na periferia do oócito (Figura 4 B e C) e muitas mitocôndrias adjacentes às gotas lipídicas (Figura 4 B e D). Observou-se também presenças de PCCs com projeções terminando no espaço perivitelínico (Figura 4 C).

Os oócitos dos grupos F 0,05 mM – Bloq e do grupo F 0,05 mM – Bloq/Rev apresentaram morfologia do citoplasma semelhante ao grupo controle 24 horas, com os grânulos corticais na periferia do oócito e uma boa quantidade de microvilosidades na membrana vitelínica (Figura 5 A e C). Por outro lado, os oócitos do grupo F 0,1 mM – Bloq e do grupo F 0,1 mM – Bloq/Rev apresentaram uma alta metabolização dos lipídios, indicada pela presença de inúmeras figuras mielínicas (Figura 5 B). Além disso, foi observada uma desorganização do citoplasma e ausência total de microvilosidades (Figura 5 B e D). Em ambos os grupos tratados com F 0,1 mM observou-se ainda retículo endoplasmático liso dilatado na periferia do oócito (Figura 5 B). Independente da dose usada, a expansão das células da granulosa só foi observada nos grupos de oócitos que foram revertidos.

Apesar de não ter havido diferença na taxa de formação de blastocistos entre os grupos controle e tratamentos (Tabela 4), observou-se uma maior taxa de células em apoptose no grupo de blastocistos produzidos a partir de oócitos maturados por 6 horas com a maior concentração de forskolin seguidos pela reversão por 18 horas (0,1 mM) (Tabela 5 – $P < 0,05$ – Figura 7).

Os blastocistos que foram produzidos a partir de oócitos maturados por 6 horas com diferentes concentrações de forskolin seguidos da maturação por 18 horas em meio

livre de forskolin apresentaram características similares quando avaliados na microscopia eletrônica de transmissão (MET). Observou-se a presença de mitocôndrias associadas a grânulos lipídicos e retículos endoplasmáticos lisos (Figura 6 A e A'). Da mesma forma o complexo de Golgi foi observado na maioria dos grupos estudados (Figura 6 A', B, B', C, C', D'). Junções entre as células do trofoblasto foi comumente observada entre as células de todos os grupos (Figura 6 C e D').

Discussão

Um dos fatores agravantes encontrado para as baixas taxas da PIV consiste na remoção do oócito de seu ambiente folicular, com consequente perda da interação morfológica, hormonal e molecular entre oócito e células foliculares e a soma desses fatores determina o prejuízo na qualidade e competência oocitária, levando à diminuição na produção de blastocistos, quando comparada àquela obtida *in vivo* (Gottardi e Mingoti, 2009).

Desde meados dos anos 30, Pincus e Enzmann (1935) já haviam demonstrado que os oócitos de mamíferos quando removidos de seus ambientes foliculares e cultivados em meio de maturação recomeçam a meiose espontaneamente, mesmo na ausência de estimuladores hormonais. Essa informação nos leva a entender que o folículo contém fatores bloqueadores da meiose.

O forskolin tem sido usado no meio de maturação como inibidor da meiose, por ser um estimulador direto da unidade catalítica da enzima adenilato ciclase, justamente por estimular a cAMP em células somáticas (Dekel et al., 1984; Sirard 1990).

A partir da concentração do forskolin 0,1mM já existente em experimentos anteriores utilizada para atrasar ou inibir o reinício da meiose (Dekel et al., 1984; Sirard, 1990; Bilodeau et al., 1993; Bilodeau-Goessels, 2006), foi determinado utilizar nesse

experimento concentrações menores, a fim de não causar degenerações ao oócito e consequentemente ao embrião.

Desta forma, foram usadas três concentrações diferentes de forskolin durante um período de 6 horas: 0,025 mM; 0,05 mM e 0,1 mM e foi observada uma similaridade na resposta as doses, uma vez que independente da concentração, a maioria dos oócitos permaneceu em QVG ou em M I durante o período de tratamento.

No presente experimento nenhum grupo manteve seu núcleo em estágio de VG – o que seria desejado – independente da concentração do forskolin utilizada. Talvez, esse efeito negativo, pode ser um reflexo do baixo tempo que os oócitos foram mantidos com o forskolin, na tentativa de serem bloqueados, uma vez que a literatura indica um período de 24 horas (Bilodeau et al., 1993; Imai et al., 2002). Entretanto, em nosso laboratório em experimentos anteriores, já foi testado o tempo de bloqueio com 24 horas, mas foram obtidas grandes taxas de degeneração nuclear (VG: $0 \pm 1,6$; QVG: $8,7 \pm 4,1$; MI: $35,9 \pm 7,4$; MII: $1,9 \pm 5,6$; Deg/NI: $40,9 \pm 5,9$ – $P < 0,05$).

Com isso, o tempo para o bloqueio da meiose desse experimento foi definido segundo estudos anteriores (Sirard e First, 1988; Sirard et al., 1989) os quais demonstraram que a QVG ocorre com 6 a 9 horas, ou seja, com 8 horas mais ou menos, o oócito já deve ter retomado a meiose (Bilodeau et al., 1993).

Sirard (1990) encontrou um grande número de oócitos em QVG logo após sua aspiração. Da mesma forma, nesse experimento, também foi encontrado um grande número de oócitos com seu núcleo em QVG (dados não demonstrados). Uma explicação fundamental pode ser pelo grande tempo que o oócito levou do abatedouro até o laboratório, fazendo seu núcleo entrar em maturação precoce, talvez pelos processos *pos-mortem* do animal. Uma segunda explicação pode ser que nas condições do presente experimento, o bloqueio foi realizado na presença do FSH no meio de

maturação, o que poderia estar atuando como um ativador da PDE induzindo parcialmente a degradação de certos níveis de cAMP, apesar da presença do forskolin.

Existem muitos trabalhos demonstrando a reversão meiótica após o bloqueio (Guixue et al., 2001; Bilodeau-Goeseels, 2003; Marques et al., 2007; Adona et al., 2008). Para determinar se a maturação nuclear é reversível, os oócitos são cultivados na presença de bloqueadores e seguida em meios livres dos bloqueadores e seus núcleos avaliados logo após (Bilodeau-Goeseels, 2003).

Entretanto, até o presente momento, não foram encontrados na literatura trabalhos com o forskolin bloqueando oócito bovinos seguido pela reversão meiótica. Pela primeira vez, após o bloqueio dos oócitos com o forskolin durante 6 horas com as três concentrações (0,025 mM, 0,05 mM e 0,1 mM) foi testada reversão meiótica desses oócitos, por um período de 18 horas.

Observou-se um grande número de oócitos estacionados em M I quando o forskolin foi utilizado na concentração de 0,1 mM, diferenciando somente do grupo Controle. Pode-se dizer que o forskolin em sua maior dosagem possui um pequeno efeito retardatório sobre a M I, entretanto sem prejudicar a maturação final, uma vez que nessa concentração os índices de M II não diferiram entre os grupos.

A reversão do bloqueio meiótico aconteceu de forma semelhante independente da concentração de forskolin utilizada, já que ao final do período de maturação o grupo Controle e todos os tratamentos se encontram igualmente em M II. Esses resultados são superiores aos de alguns autores que encontraram em seu experimento a maior parte dos oócitos parados em VG (84,4%) e nenhum em M II após o término da MIV com forskolin (Katska-Ksiazkiewicz et al., 2011).

A atividade, a morfologia e a distribuição mitocondrial podem ser usadas como critérios de avaliação da qualidade e competência de oócitos (Nagai et al., 2006;

Egerszegi et al., 2010), além de ser uma chave para o início da apoptose. Existe um aumento na intensidade de fluorescência mitocondrial durante a maturação (Katska-Ksiazkiewicz et al., 2011) e a respiração da mitocôndria em oócitos está intimamente relacionada com a competência do desenvolvimento embrionário (Stojkovic et al., 2001; Torner et al., 2004).

Ambruosi et al. (2009) estabeleceram três padrões sobre avaliação mitocondrial em oócitos em M II. 1) Distribuição homogênea de pequenos grânulos de mitocôndrias pelo citoplasma: indica um citoplasma oocitário imaturo. 2) Distribuição heterogênea de pequenos e/ou grandes grânulos de mitocôndrias: indica um citoplasma oocitário maduro. 3) Acumulação de mitocôndrias na região periférica e/ou ao redor do núcleo: maturação citoplasmática completa.

No presente experimento, foi utilizada MitoTacker Orange CMTM Ros, para avaliação da atividade oxidativa mitocondrial. Esta sonda é sequestrada rapidamente pelas organelas que estão respirando ativamente dependendo de sua atividade oxidativa (Toner et al., 2004; Ambruosi et al., 2009; Katska-Ksiazkiewicz et al., 2011). Não foi observada diferença na intensidade de fluorescência entre os grupos, indicando que independente da dose do forskolin a atividade mitocondrial se manteve estável.

Quando a distribuição das mitocôndrias no citoplasma oocitário foi avaliada foram encontradas duas formas basicamente: a heterogênea e a homogênea. Entretanto, a distribuição heterogênea prevaleceu em todos os grupos tratados com forskolin, não se diferenciando do grupo Controle e segundo Ambruosi et al. (2009) essa distribuição indica um citoplasma maduro do oócito. Esses achados reforçam o conceito de que mesmo na presença do forskolin, o oócito foi capaz de sofrer maturação citoplasmática e que as mitocôndrias apresentam papéis fundamentais na mensuração da maturação

oocitária associada a maturação nuclear a partir de suas distribuição e movimentação pelo citoplasma.

A partir da avaliação da ultraestrutura por microscopia eletrônica de transmissão (MET), foi possível observar que o grupo de oócitos avaliados imediatamente após a aspiração (grupo Imaturo - 0 hora) apresentou células da granulosa compactas e grânulos corticais localizados na região central do ooplasma, em forma de clusters. Estas características são sinais marcantes de imaturidade oocitárias (Hyttel, 2011), esperadas neste grupo. Além disso, foram observadas mitocôndrias e gotas lipídicas em grande número, assim como relatado por Auclair et al. (2013). Esse grupo de oócitos imaturos se caracterizou com um espaço perivitelínico maior que os demais grupos.

As células do *cumulus* possuem numerosas projeções, chamadas de projeções das células do *cumulus* (PCCs) as quais atravessam a zona pelúcida até chegarem ao oolema (Hyttel et al., 1986). Basicamente existem dois tipos de junções que compõe as PCCs, as junções Gap que são encontradas entre as células da granulosa adjacentes e as junções intermediárias que estão entre as microvilosidades das células da granulosa e o oócito (Hyttel, 2011). No grupo de oócitos Imaturos foram observadas somente as junções intermediárias entre as microvilosidades, isto pode acontecer devido aos cortes obtidos no presente experimento.

Hyttel et al. (1986) e Hyttel (2011) descreveram que com o desenvolvimento oocitário, as mitocôndrias e os grânulos lipídicos se direcionam à periferia do oócito; entretanto, quando o oócito encontra-se num estado maduro, essas duas estruturas posicionam-se numa região mais central do ooplasma, enquanto que os grânulos corticais caminham para a periferia (Hyttel, 2011). Essas observações também foram encontradas no grupo de oócitos maturados por 24 horas (grupo Controle), onde os grânulos corticais passaram a ser observados distribuídos na periferia dos oócitos.

No grupo Controle, foi observada também a associação das mitocôndrias, gotas lipídicas e do retículo endoplasmático liso, formando a unidade metabólica (Kruip et al., 1983; Hyttel, 2011). As PCCs ainda estavam presentes, em forma de junções intermediárias, entretanto atravessando a zona pelúcida e não se ligando mais ao oolema, mas retraindo suas projeções finais no espaço perivitelínico.

Os oócitos do grupo F 0,05 mM – Bloq e do grupo F 0,05 mM – Bloq/Rev apresentaram uma boa preservação do citoplasma, com morfologia semelhante aos grupos controle. Os grânulos corticais apareceram na periferia do oócito e uma boa qualidade de microvilosidades foi observada na membrana vitelínica. Essas características assemelham-se com oócitos maduros da literatura (Hyttel et al., 1986; Hyttel, 2011).

Tanto os oócitos do grupo que foram bloqueados, quanto os bloqueados e revertidos com a maior dose de forskolin (grupos F 0,1mM – Bloq e F 0,1mM – Bloq/Rev, respectivamente) apresentaram uma alta metabolização de lipídio citoplasmático, representada pela visualização figuras mielínicas em abundância. Além disso, foi observada uma desorganização do citoplasma, indicando uma possível desestruturação do citoesqueleto a qual foi evidenciada pela total ausência de microvilosidades no espaço perivitelínico. Essas alterações quando analisadas em conjunto indicam uma severa alteração do metabolismo oocitário.

Os oócitos que foram somente bloqueados com o forskolin (F 0,1 mM – Bloq e F 0,05 mM – Bloq) apresentaram um número bem maior de mitocôndrias quando comparados com seu respectivo grupo seguidos da reversão meiótica. Esse evento pode estar demonstrando o momento ideal da metabolização oocitária, que pode estar ocorrendo por volta das 6 horas após o bloqueio, sendo estimulado mais ainda pelo forskolin, independente de sua concentração.

A literatura indica o forskolin como um eficiente inibidor da maturação nuclear em oócitos (Ekholm et al., 1984; Racowsky, 1984; Sirard, 1990 Bilodeau et al., 1993), mas nenhum trabalho produziu embriões *in vitro* após o bloqueio desses oócitos com esse agente seguido da reversão. Desta forma, esse experimento produziu pela primeira vez embriões *in vitro* a partir de oócitos bloqueados com o forskolin nas três concentrações diferentes (0,025 mM, 0,05 mM e 0,1 mM) por um período de 6 horas, sendo prontamente revertidos em meio livre do agente bloqueador, durante 18 horas. Todas as concentrações foram capazes de produzir embriões de forma similar ao grupo Controle, ou seja, a taxa de blastocisto não foi afetada pelos tratamentos.

Adona et al. (2008) também não encontraram diferença na taxa de blastocisto, quando utilizaram butirolactona e roscovitina para bloquear a meiose, assemelhando-se com as taxas do presente experimento (variaram de 25,8% a 36,5%). Segundo esses autores acima, a taxa de clivagem, taxa de blastocisto e o número total de células, não são afetadas pelas modificações na maturação *in vitro*.

Ao contrário, Hashimoto et al. (2002) obtiveram um aumento na taxa de blastocistos, utilizando butirolactona como bloqueador, associado a diferentes condições de cultivo, inclusive uma baixa concentração sérica de 5%. Nesse caso, podemos constatar que nesse trabalho foi utilizada uma concentração de 10% de SFB na MIV e talvez seja esse o fator agravante durante o bloqueio meiótico. Kubelka et al. (2000) relataram que o uso do SFB no meio de maturação resulta na perda parcial da capacidade de bloqueio.

Quando Imai et al. (2002) avaliaram o número total de células em embriões que foram bloqueados com a butirolactona por 24 horas e revertidos por 20 horas, não encontraram diferenças. Lonergan et al. (2000); Mermillod et al. (2000); Adona et al. (2008) também não encontraram diferença no número total de células. Esses resultados

estão de acordo com o presente experimento, onde independente da concentração utilizada de forskolin para bloquear a meiose, o número total de células se manteve igual ao grupo Controle.

Entretanto, a melhor forma para se avaliar a qualidade embrionária é através da apoptose, uma vez que uma alta incidência desta está associada com a redução da viabilidade embrionária (Byrne et al., 1999). Uma das formas de quantificação da apoptose é através da reação de TUNEL, que possibilita a detecção *in situ* de células apoptóticas, pela marcação da fragmentação oligonucleossomal do DNA geradas pela atividade de DNAases endógenas durante o processo de apoptose (Gjorret et al., 2003).

A apoptose de células embrionárias tem recebido uma crescente atenção, principalmente devido ao seu papel em resposta às condições de subdesenvolvimento. Assim, o aumento da apoptose celular consiste num indicador de condições inadequadas de cultivos *in vitro* para oócitos (Kim et al., 2008).

A maioria dos trabalhos demonstra que a melhor concentração do forskolin para bloquear a meiose é de 0,1 mM (Sirard, 1990; Bilodeau et al., 1993). Entretanto, apesar dessa dose de forskolin ser eficiente para bloquear a meiose e de não ter tido diferença na taxa de formação de blastocistos e no número total de células íntegras entre os grupos Controle e tratamentos, houve uma maior taxa de células apoptóticas no grupo de blastocistos que foram tratados com essa dose por 6 horas e revertidos por 18 horas na MIV. Isso demonstra que a maior dose desse agente pode induzir a degeneração embrionária.

Esse achado é de grande interessante, pois a concentração de 0,1 mM normalmente utilizada pelos autores (Dekel et al., 1984; Sirard, 1990; Bilodeau et al., 1993; Bilodeau-Goessels, 2006) foi a que mais prejudicou os oócitos desse experimento, demonstrado pela alteração da ultraestrutura citoplasmática. Esta

alteração, embora não tenha sido suficiente para reduzir a taxa de formação de blastocistos, levou a formação de embriões de pior qualidade, com um maior índice de células apoptóticas.

Basicamente no citoplasma de todos os grupos embrionários, foram observadas associações de grânulos lipídicos distribuídos, retículo endoplasmático liso e mitocôndrias. De acordo com Kruip et al. (1983) e Hyttel (2011) a associação de mitocôndrias e lipídios indica a formação de unidades metabólicas. A presença destas unidades metabólicas funcionais é um indicativo de alta atividade metabólica na célula (Sturmeijer et al., 2006). Com o desenvolvimento do embrião as mitocôndrias começam a se alongar apresentando cristas transversais e o retículo endoplasmático rugoso começa a se desenvolver, sinalizando a síntese proteica (Hyttel, 2011).

No presente experimento o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático liso encontravam-se bem evidentes em todos os grupos, indicando uma boa distribuição das ultraestruturas e as junções tight foram visualizadas entre os blastômeros dos grupos F 0,05 mM e F 0,1 mM.

O desenvolvimento completo do embrião é demonstrado pela presença da massa celular interna associada à cavidade da blastocela que são envolvidas pelo trofoblasto. Os trofoblastos são conectados pelas junções tight e desmosomos enquanto que as massas celulares internas são conectadas pelas junções densas (coating) (Hyttel, 2011). Essas junções tight encontraram-se organizadas em microvilosidades e são responsáveis por manter a histoarquitetura do embrião (Bhojwani et al., 2007).

Conforme o embrião se desenvolve os espaços intercelulares diminuem, pois a blastocela se torna mais organizada e ocupa uma proporção maior do embrião (Crosier et al., 2001) e o citoplasma passará a ocupar uma proporção decrescente do blastocisto, devido ao aumento desse fluido dentro da blastocela e do subsequente achatamento das

células embrionárias (Linares e Ploen, 1981; Crosier et al., 2001). Nesse experimento, em nenhum grupo foram observados os espaços intercelulares, pois todos os embriões utilizados eram expandidos ou eclodidos, o que causou uma diminuição desses espaços intercelulares.

Conclusão

O forskolin utilizado sozinho, por 6 horas, não foi eficiente em bloquear o reinício da meiose. Todos os grupos experimentais alcançaram o estágio de M II após serem maturados sob diferentes concentrações de forskolin, no entanto, na concentração de 0,1 mM foi observado um grande número de oócitos ainda em M I mesmo após 24 horas de maturação. A maior concentração do agente levou a alterações ultraestruturais nos oócitos, mas não influenciou a taxa de produção embrionária. Apesar disso, nesta concentração, foi observado um alto índice de apoptose celular.

Referências

Adona PR, Pires PRL, Quetglas MD, Schwarz KRL, Leal CLV, 2008: Nuclear maturation kinetics and *in vitro* embryo development of cattle oocytes prematured with butyrolactone I combined or not combined with roscovitina. *Animal Reprod Sci* **104**, 389-397.

Ambruosi B, Lacalandra GM, Iorga AI, Santis T, Mugnier S, Matarrese R, Goudet G, Dell'Aquila ME, 2009: Cytoplasmic lipid droplets and mitochondrial distribution in equine oocytes: implications on oocyte maturation, fertilization and developmental competence after ICSI. *Theriogenology* **71**, 1093-1104.

- Auclair S, Uzbekov R,; Elis S, Sanchez L, Kireev I, Lardic L, Dalbies-Tran R, Uzbekova S, 2013: Absence of cumulus cells during *in vitro* maturation affects lipid metabolism in bovine oocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **67**, E599-E613.
- Bhojwani S, Tomek W, Jonas L, Becker F, Alm H, Torner H, Kanitz W, Poehland R, 2007: Ultrastructural analysis reveals striking differences of intercellular contact lengths in bovine embryos produced *in vivo*, *in vitro* and by somatic cell nuclear transfer *Mol Reprod Devel* **74**, 775-784.
- Bilodeau S, Fortier MA, Sirard MA, 1993: Effect of adenylate cyclase stimulation on meiotic resumption and cyclic AMP content of zona-free and cumulus-enclosed bovine oocytes *in vitro*. *J Reprod Fertil* **97**, 5-11.
- Bilodeau-Goeseels S, 2006: Effects of culture media and energy sources on the inhibition of nuclear maturation in bovine oocytes. *Theriogenology* **66**, 297-306.
- Bilodeau-Goeseels, S 2012: Bovine oocyte meiotic inhibition before *in vitro* maturation and its value to *in vitro* embryo production: does it improve developmental competence? *Reprod Dom Anim* **47**, 687-693.
- Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ, 1999: Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J Reprod Fertil* **117**, 97-105.
- Crosier, AE, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE, Farin CE, 2001: Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. *Biol Reprod* **64**, 1375-1385.
- Dekel N, Aberdam E, Sherizly I, 1984: Spontaneous maturation in vitro cumulus-enclosed rat oocytes is inhibited by forskolin. *Biol Reprod* **32**, 244-250.
- Edwards RG, 1965: Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* **208**, 349-351.

- Egerszegi I, Alm H, Ratky J, Heleil B, Brüssow KP, Torner H, 2010: Meiotic progression, mitochondrial features and fertilisation characteristics of porcine oocytes with different G6PDH activities. *Reprod Fertil Dev* **22**, 930-938.
- Ekholm C, Hillensjö T, Magnusson C, Rosberg S, 1984: Stimulation and inhibition of rat oocyte meiosis by forskolin. *Biol Reprod* **30**, p.537-543.
- Gilchrist RB, 2011: Recent insights into oocyte follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to *in vitro* maturation. *Reprod Fertil Dev* **23**, 23-31.
- Gilchrist RB, Thompson JC, 2007: Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potencial *in vitro*. *Theriogenology* **67**, 6-15.
- Gjorret JO, Knijn HM, Dieleman SJ, Avery B, Larsson Lars-Inge, Maddox-Hyttel Poul, 2003: Chronology of apoptosis in bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. *Biol Reprod* **69**, 1193-1200.
- Gottardi FP, Mingoti GZ, 2009: Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. *Rev Bras Reprod* **33**, 82-94.
- Guixue Z, Luciano AM, Coenen K, Gandolfi F, Sirard MA, 2001 : The influence of camp before or during bovine oocyte maturation on embryonic developmental competence. *Theriogenology* **55**, 1733-1743.
- Hashimoto S, Minami N, Takaura R, Imai H, 2002: Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest *in vitro*. *Biol Reprod* **66**, 1696-1701.
- Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H, 1999: High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* **52**, 683-700.

- Huang FJ, Chang SY, Tsai MY, Lin YC, Kung FT, Wu JF, Lu YJ, 1999: Relationship of the human cumulus-free oocyte maturational profile with *in vitro* outcome parameters after intracytoplasmic sperm injection. *J Assisted Reprod Genetics* **16**, 483-487.
- Hyttel P, 2011: Oocyte maturation and fertilization: a long history for a short event. *Cap I: Electron microscopy of mammalian oocyte development, maturation and fertilization*, 1-37.
- Hyttel P, Callesen H, Greve T, 1986: Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. *J Reprod Fert* **76**, 645-656.
- Hyttel P, Greeve T, Callesen H, 1989: Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *J Reprod Fertil* **38**, 35-47.
- Imai K, Kobayashi S, Kaneyama K, Kojima T, Nagai T, 2002: Effects of butyrolactone-I on GVBD in bovine oocytes and subsequent maturation, fertilization and development *in vitro*. *J Reprod Devel* **48**, 249-255.
- Janssenswillen C, Nagy ZP, Van Steirteghem A, 1995: Maturation of human cumulus-free germinal vesicle-stage oocytes to metaphase II by coculture with monolayer vero cells. *Human Reprod* **10**, 375-378.
- Katska-Ksiazkiewicz L, Alm H, Torner H, Heleil B, Tuchscherer A, Rynska B, 2011: Mitochondrial aggregation patterns and activity in *in vitro* cultured bovine oocytes recovered from early antral ovarian follicles. *Theriogenology* **75**, 662-670.
- Kim Chi-Gu, Yong H, Lee G, Cho J, 2008: Effect of the polyvinylpyrrolidone concentration of cryoprotectant on mouse embryo development and production of pups: 7.5% of PVP is beneficial for *in vitro* and *in vivo* development of frozen-thawed mouse embryos. *J Reprod Dev* **54** 250-253.

- Krisher RL, Bavister BD, 1998: Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology* **59**, 103-114.
- Kruip TAM, CRan DG, Van Beneden TH, Dieleman SJ, 1983: Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vivo*. *Gamete Research* **8**, 29-47.
- Kubelka M, Motlík J, Schultz RM, Pavlok A, 2000: Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromossome condensation activity. *Biol Reprod* **62**, 292-302.
- Linares T, Ploen L, 1981: On the ultrastructure of seven day old normal (blastocysts) and abnormal bovine embryos. *Anat Histol Embryol* **10**, 212-226.
- Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Yang X, Boland M, 2000: Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I. *Mol Reprod Dev* **57**, 204-209.
- Marques MG, Nicacio AC, Oliveira VP, Nascimento AB, Caetano HVA, Mendes CM, Mello MRB, Milazzotto MP, Assumpção MEO D'Avila, Visintin JA, 2007: *In vitro* maturation of pig oocytes with different media, hormone and meiosis inhibitors. *Animal Reprod Sci* **97**, 375–381.
- Mermillod P, Tomanek M, Marchal R, Meijer L, 2000: High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. *Mol Reprod Devel* **55**, 89-95.
- Nagai S, Mabuchi T, Hirata S, Shoda T, Kasai T, Yokota S, Shitara H, Yonekawa H, Hoshi K, 2006: Correlation of abnormal mitochondrial distribution in mouse oocytes with reduced developmental competence. *J Exp Med* **210**, 137-144.
- Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL, 1995: Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* **44**, 859-869.

- Pincus G, Enzmann EV, 1935: The comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*: I. The activation of ovarian eggs. J Exp Med **62**(5), 665-675.
- Racowsky C, 1984: Effect of forskolin on the spontaneous maturation and cyclic AMP content of rat oocyte-cumulus complexes. J Reprod Fertil **72**, 107-116.
- Sirard MA, First NL, 1988: *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. Biol Reprod **39**, 229-234.
- Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML, First NL, 1989: Timing of progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. Biol Reprod **40**, 1257-1263.
- Sirard, MA, 1990: Temporary inhibition of meiosis resumption *in vitro* by adenylate cyclase stimulation in immature bovine oocytes. Theriogenology **33**, 757-767.
- Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçalves PB, Wolf E, 2001: Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. Biol Reprod **64**, 904-909.
- Sturmey RG, O'toole PJ, Leese HJ, 2006: Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial: lipid association in the porcine oocyte. Reprod **132**, 829-837.
- Tarazona AM, Rodriguez JI, Restrepo LF, Olivera-Angel M, 2006: Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced *in vitro*. Reprod Dom Anim **41** 5-11.
- Torner H, Brüssow KP, Alm H, Ratky J, Pöhland R, Tuchscherer A, Kanitz W, 2004: Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of pre-ovulatory maturation. Theriogenology **61**, 1675-1689.

Wu D, Cheung QC, Wen L, Li J, 2006: A growth-maturation system that enhances the meiotic and developmental competence of porcine oocytes isolated from small follicles. Biol Reprod 75, 547-554.

Tabela 1: Avaliação da maturação nuclear com Hoechst 33342 de oócitos maturados por 6 horas com diferentes concentrações de forskolin. Total de 8 réplicas com 298 oócitos (média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão).

Tratamentos	Estágios de Desenvolvimento do Núcleo				
	VG	QVG	M I	M II	D/NI
Controle (6 horas)	8,4 $\pm$ 4,5	36,9 $\pm$ 7,2	28,2 $\pm$ 6,7	3,5 $\pm$ 1,2	23,0 $\pm$ 5,6
F 0,025 mM – Bloq	2,3 $\pm$ 4,5	35,1 $\pm$ 7,2	29,8 $\pm$ 6,7	0,0 $\pm$ 1,2	20,3 $\pm$ 5,6
F 0,05 mM – Bloq	2,7 $\pm$ 4,5	35,1 $\pm$ 7,2	42,1 $\pm$ 6,7	0,0 $\pm$ 1,2	20,0 $\pm$ 5,6
F 0,1 mM – Bloq	12,5 $\pm$ 4,5	49,8 $\pm$ 7,2	22,1 $\pm$ 6,7	0,6 $\pm$ 1,2	14,9 $\pm$ 5,6

VG: Vesícula Germinativa; QVG: Quebra da Vesícula Germinativa; M I: Metáfase I; M II: Metáfase II; D/NI: Degenerado ou Não Identificado. Não houve diferença estatística ($P > 0,05$).

Tabela 2: Avaliação da maturação nuclear com Hoechst 33342 de oócitos maturados por 6 horas com diferentes concentrações de forskolin, seguido da maturação livre do agente por 18 horas. Total de 8 réplicas com 336 oócitos (média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão).

Tratamentos	Estágios de Desenvolvimento do Núcleo				
	VG	QVG	M I	M II	D/NI
Controle	0,0 $\pm$ 1,3	0,8 $\pm$ 1,8	8,3 $\pm$ 5,9 ^a	67,7 $\pm$ 8,3	7,3 $\pm$ 3,4
F 0,025 mM – Bloq/Rev	2,8 $\pm$ 1,3	0,7 $\pm$ 1,9	20,8 $\pm$ 6,4 ^{ab}	67,7 $\pm$ 8,9	8,9 $\pm$ 3,7
F 0,05 mM – Bloq/Rev	0,0 $\pm$ 1,5	4,4 $\pm$ 2,1	15,8 $\pm$ 7,0 ^{ab}	65,9 $\pm$ 9,8	13,7 $\pm$ 4,1
F 0,1 mM – Bloq/Rev	0,0 $\pm$ 1,4	1,0 $\pm$ 1,9	34,1 $\pm$ 6,4 ^b	50,2 $\pm$ 8,9	14,6 $\pm$ 3,8

VG: Vesícula Germinativa; QVG: Quebra da Vesícula Germinativa; M I: Metáfase I, M II: Metáfase II; D/NI: Degenerado ou Não Identificado. ^{ab}Letras sobrescritas incomuns na mesma coluna diferem ($P < 0,05$).

Tabela 3: Avaliação da maturação citoplasmática a partir da intensidade de fluorescência e da distribuição das mitocôndrias com MitoTracker® Orange CMTMRos de oócitos maturados por 6 horas com diferentes concentrações de forskolin, seguido da maturação livre do agente por 18 horas. Total de 8 réplicas com 10 oócitos por grupo (média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão).

Tratamentos	Intensidade de Fluorescência	Distribuição da Mitocôndria (%)	
	($\times 10^{-6}$) da Mitocôndria	Homogênea	Heterogênea
Controle	93,6 $\pm$ 5,8	87,5	12,5
F 0,025 mM – Bloq/Rev	93,5 $\pm$ 5,8	87,5	12,5
F 0,05 mM – Bloq/Rev	86,6 $\pm$ 5,8	90,0	10,0
F 0,1 mM – Bloq/Rev	87,1 $\pm$ 5,8	85,7	14,3

Não houve diferença estatística ($P > 0,05$).

Tabela 4: Taxa de formação de blastocistos avaliados no D 7 a partir oócitos maturados por 6 horas com diferentes concentrações de forskolin, seguido da maturação livre do agente por 18 horas. Total de 8 réplicas (média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão).

Tratamentos	Total (N)		Produção de Blastocistos (%)					
	Oóc	Blast	Bi	Bl	Bx	Bn	Be	Total
Controle	166	61	8,4 $\pm$ 2,7	7,1 $\pm$ 2,3	12,7 $\pm$ 3,2	5,3 $\pm$ 1,7	3,2 $\pm$ 1,0	36,7 $\pm$ 3,7
F 0,025 mM–Bloq/Rev	136	43	11,3 $\pm$ 2,7	5,6 $\pm$ 2,3	12,0 $\pm$ 2,3	2,1 $\pm$ 1,7	1,4 $\pm$ 1,0	32,6 $\pm$ 3,7
F 0,05 mM–Bloq/Rev	138	39	5,3 $\pm$ 2,7	7,8 $\pm$ 2,3	9,3 $\pm$ 2,3	6,0 $\pm$ 1,7	0,6 $\pm$ 1,0	29,2 $\pm$ 3,7
F 0,1 mM–Bloq/Rev	144	34	10,9 $\pm$ 2,7	7,2 $\pm$ 2,3	7,0 $\pm$ 2,3	0	0	25,1 $\pm$ 3,7

Estágio de desenvolvimento embrionário avaliado no D 7: Bi: blastocisto inicial; Bl: blastocisto; Bx: blastocisto expandido; Bn: blastocisto em eclosão; Be: blastocisto eclodido. Não houve diferença estatística ($P > 0,05$).

Tabela 5: Avaliação do número total de células e do índice de apoptose de blastocistos no D 7, a partir de oócitos maturados por 6 horas com diferentes concentrações de forskolin, seguido da maturação livre do agente por 18 horas. Total de 8 réplicas com 10 a 15 embriões por grupo (média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão).

Tratamentos	Número total de células íntegras	Taxa de células em apoptose
Controle	140,1 $\pm$ 13,0	12,1 $\pm$ 2,5 ^a
F 0,025 mM – Bloq/Rev	129,9 $\pm$ 13,0	12,9 $\pm$ 2,5 ^a
F 0,05 mM – Bloq/Rev	139,0 $\pm$ 13,0	13,5 $\pm$ 2,5 ^a
F 0,1 mM – Bloq/Rev	104,4 $\pm$ 13,0	30,2 $\pm$ 2,5 ^b

^{ab} Letras sobrescritas incomuns na mesma coluna diferem (P < 0,05).

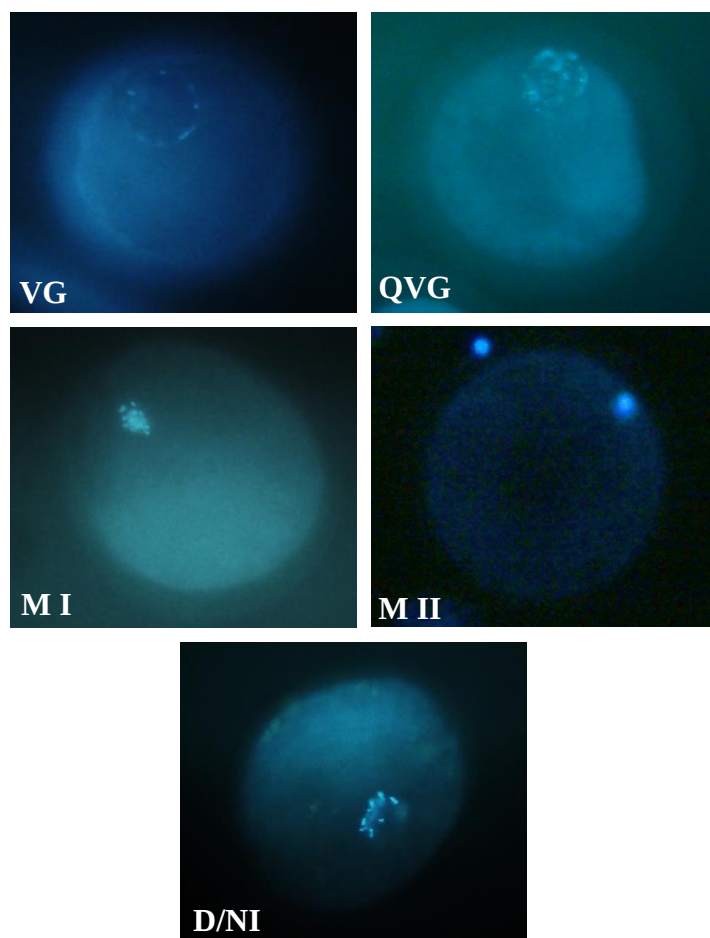


Figura 1: Apresentação fotográfica da avaliação dos estágios nucleares dos oócitos dos grupos experimentais em microscópio invertido com luz fluorescente ultra-violeta. Após a coloração com Hoechst 33342 os oócitos foram classificados em: Vesícula Germinativa (VG); Quebra da Vesícula Germinativa (QVG); Metáfase I (M I); Metáfase II (M II) e Degenerado ou Não Identificado (D/NI). Aumento de 400 x.

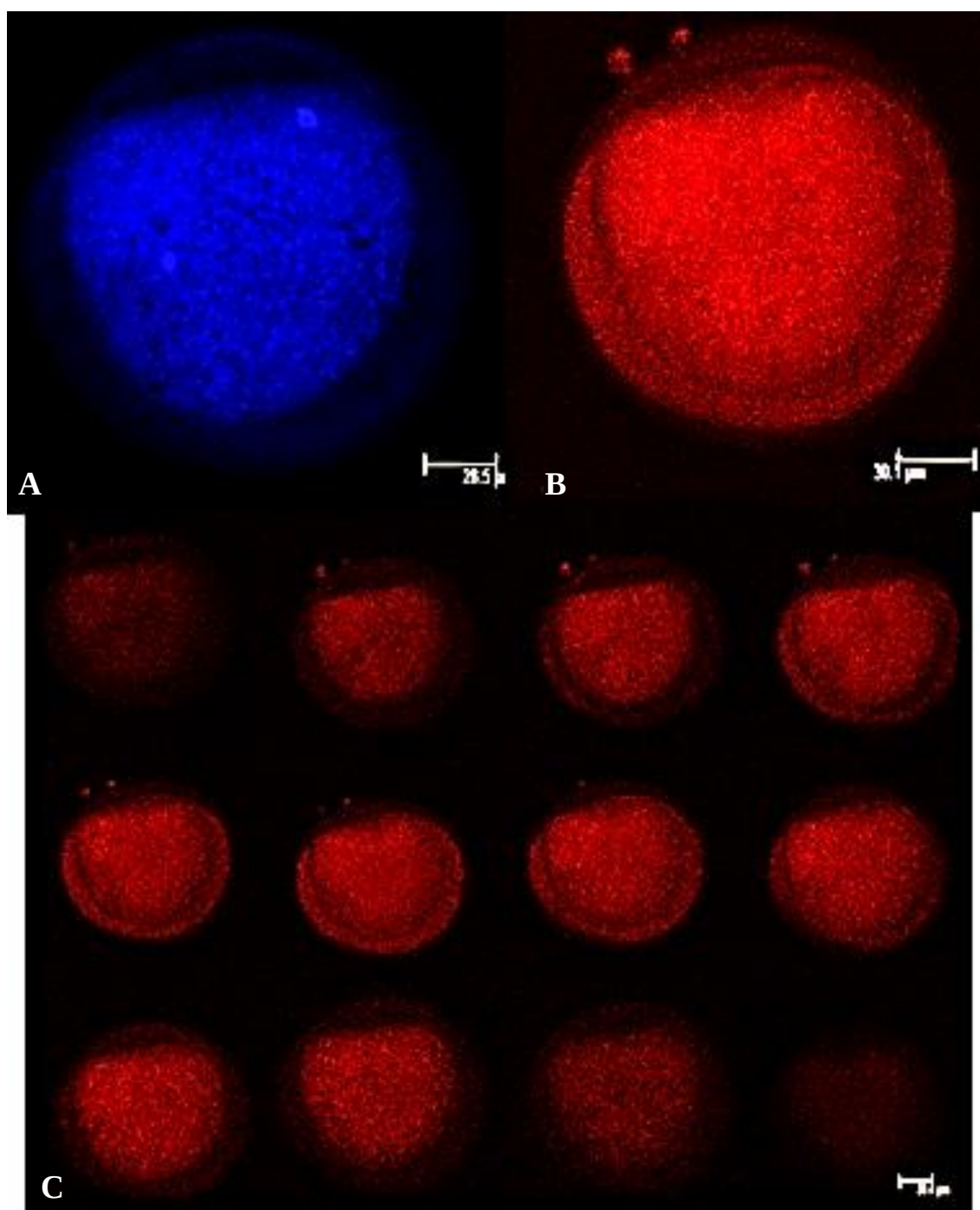


Figura 2: Imagem ilustrativa da técnica de coloração dos oócitos com MitoTracker Orange CMTMRos, avaliados em microscópio invertido a Laser Confocal. **A:** Oócito em M II corado com Hoechst 33342. **B:** Overlay do oócito corado com MitoTracker Orange CMTMRos. **C:** Vários cortes de um único oócito, realizados pelo microscópio Confocal – esses cortes referem-se ao oócito em destaque (B) (Barras: A: 28,5 µm; B: 30,1 µm; C: 30,4 µm).

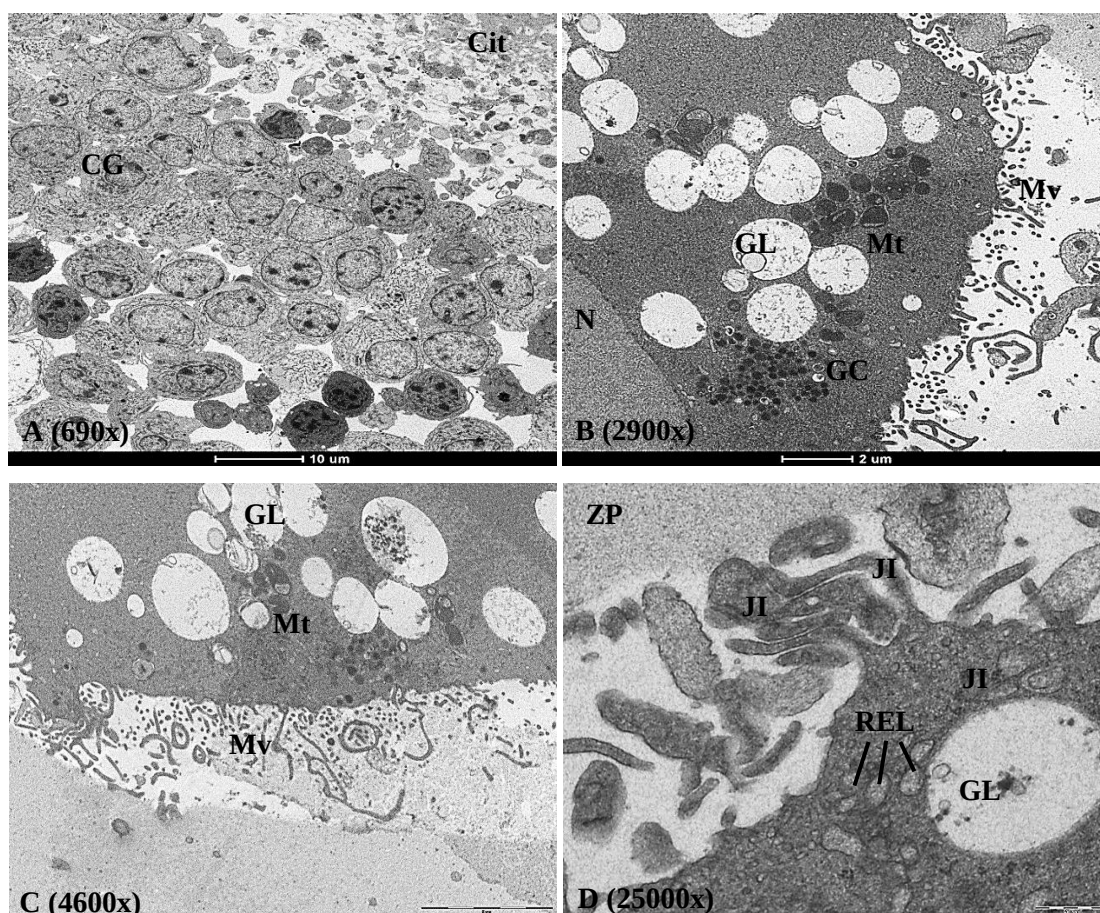


Figura 3: Avaliação em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de oócitos do grupo Imaturo (0 hora). **A:** células da granulosa (CG) bem compactas. **B:** presença de cluster de grânulos corticais (GC), mitocôndrias (Mt) e grânulos lipídicos (GL). **C:** espaço perivitelínico (EP) bem dilatado. **D:** presença de microvilosidades (Mv) e junções das células da granulosa do tipo junção intermediária (JI) e retículo endoplasmático liso (REL). Cit: citoplasma. ZP: zona pelúcida.

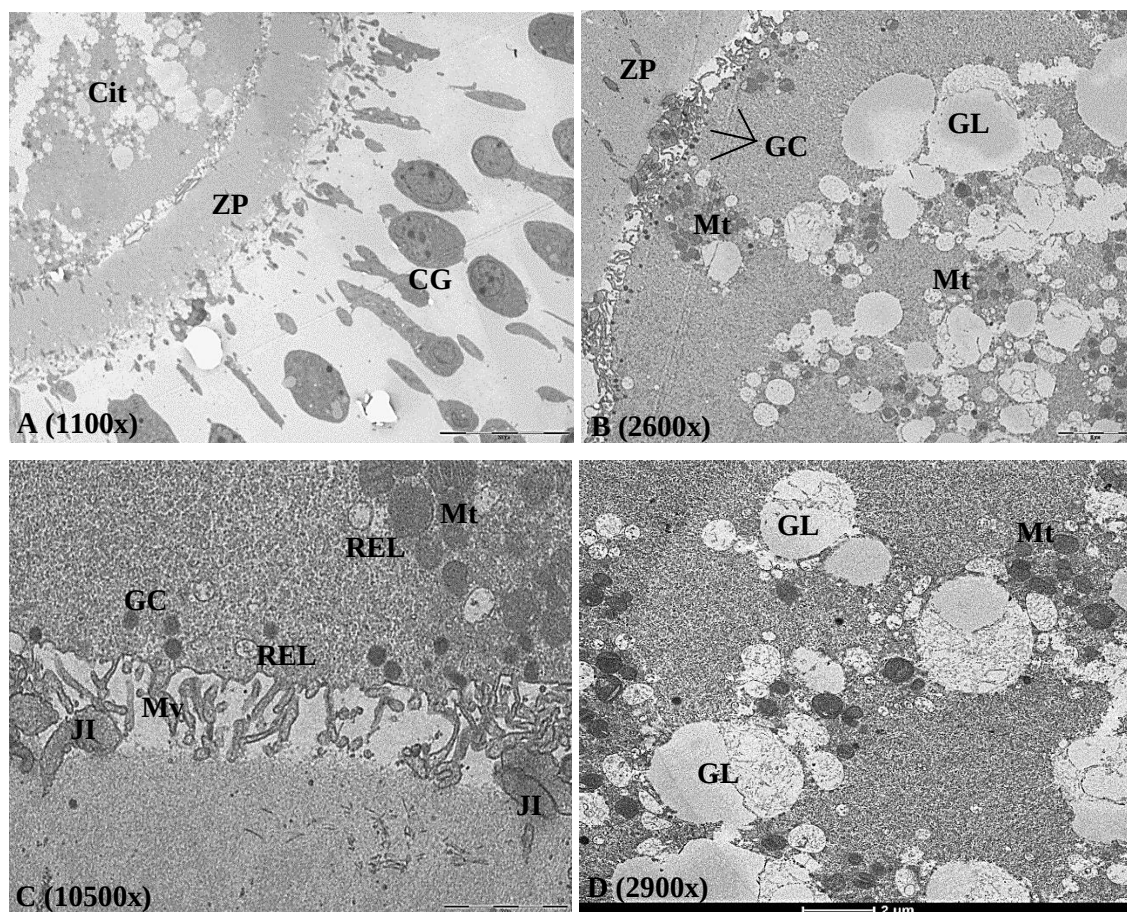


Figura 4: Avaliação em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de oócitos do grupo Controle. **A:** característica normal das células da granulosa (CG) após 24 horas de maturação, com aspecto expandido. **B:** citoplasma contendo associações de mitocôndrias (Mt) e grânulos lipídicos (GL). Observar que os clusters de grânulos corticais (GC) se desfizeram e se direcionaram para a periferia do ooplasma. **C:** resolução maior do ooplasma demonstrando a associação existente entre mitocôndrias (Mt) e retículo endoplasmático liso (REL), as junções intermediárias (JI) e os grânulos corticais (GC) periféricos. **D:** presença de grânulos lipídicos (GL) já em processo de metabolização pelas mitocôndrias (Mt). Cit: citoplasma. ZP: zona pelúcida.

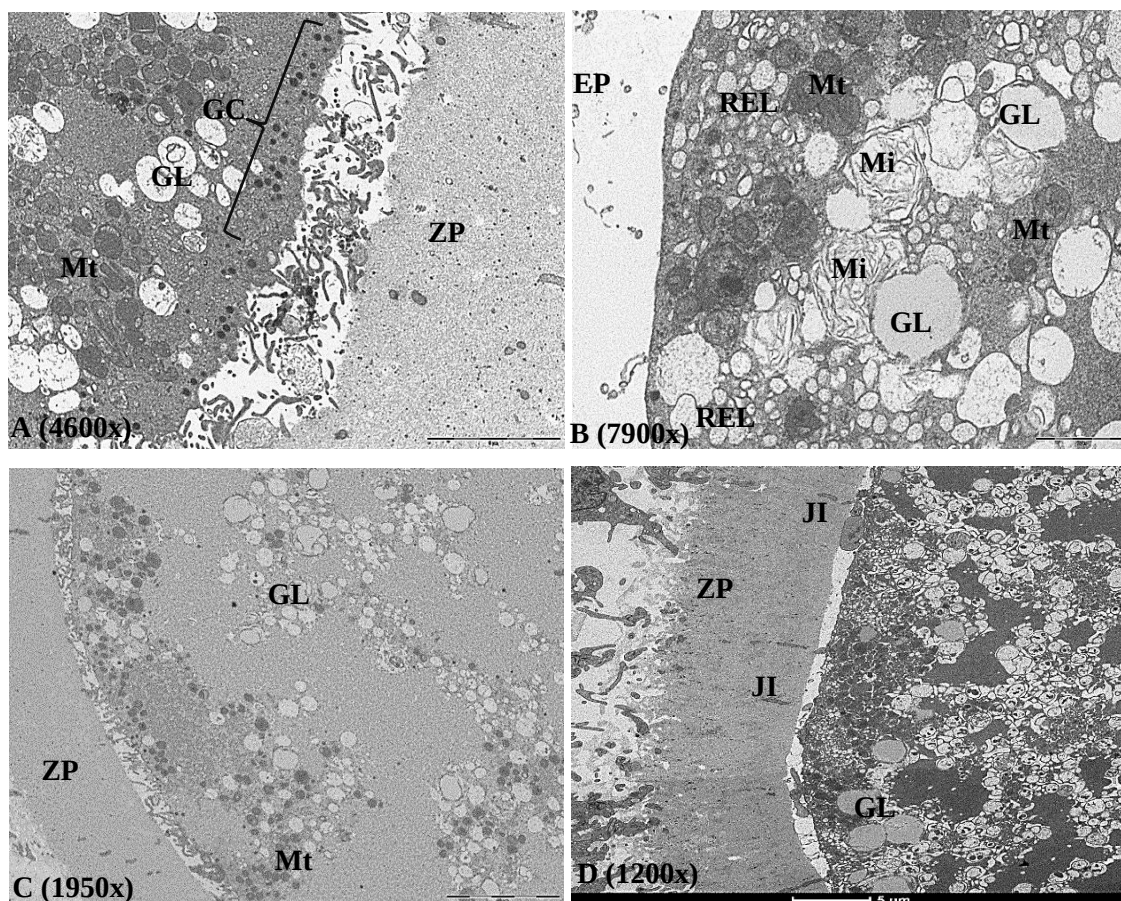


Figura 5: Avaliação em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de oócitos dos grupos somente bloqueados (A e B) e bloqueados e revertidos (C e D). **A:** Oócitos do grupo F 0,05 mM que foram bloqueados por 6 horas – apresentaram uma melhor preservação do citoplasma. **B:** Oócitos do grupo F 0,1 mM que foram bloqueados por 6 horas – apresentaram uma alta metabolização dos grânulos lipídicos (GL), demonstrado pela grande desorganização do citoplasma (Cit) e pela presença de figuras mielínicas (Mi). **C:** Oócitos do grupo F 0,05 mM que foram bloqueados por 6 horas e revertidos por 18 horas – também demonstraram uma melhor preservação de suas estruturas. **D:** Oócitos do grupo F 0,1 mM que foram bloqueados por 6 horas e revertidos por 18 horas – apresentou uma desorganização das estruturas citoplasmáticas. Mt: mitocôndrias. EP: espaço perivitelínico. JI: junção intermediária. REL: retículo endoplasmático liso. ZP: zona pelúcida.

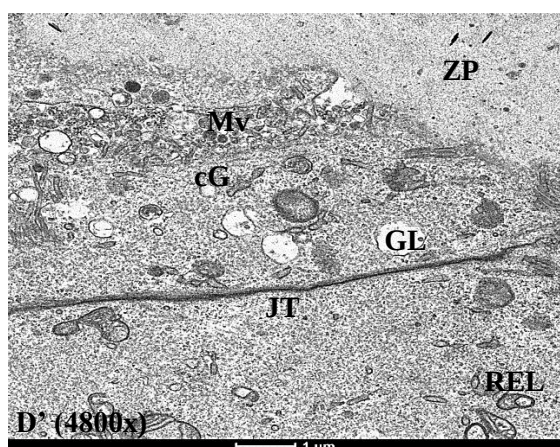
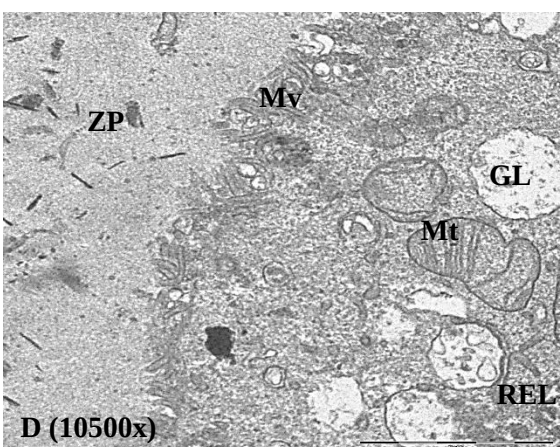
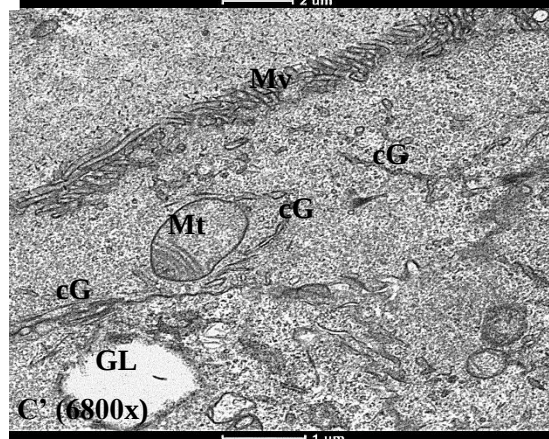
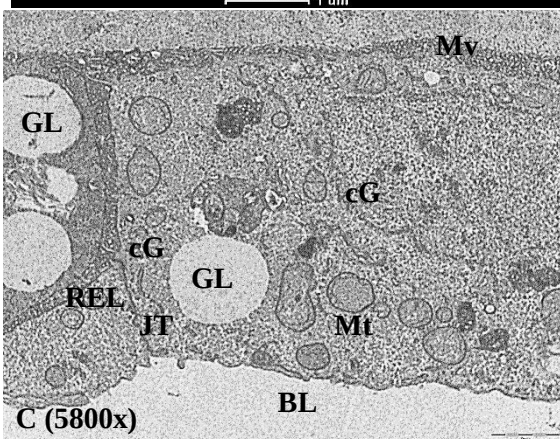
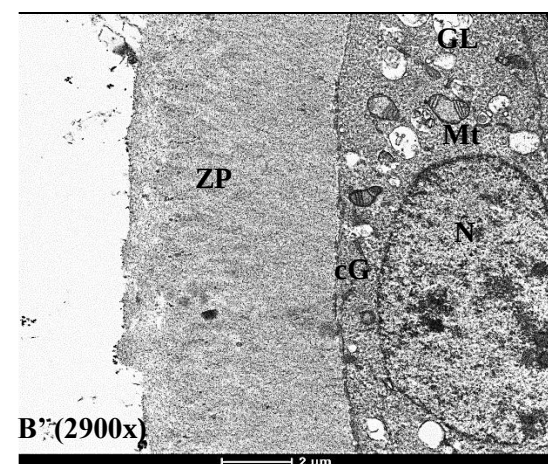
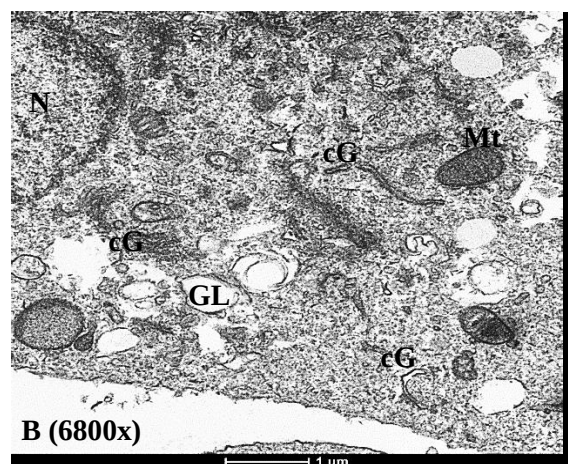
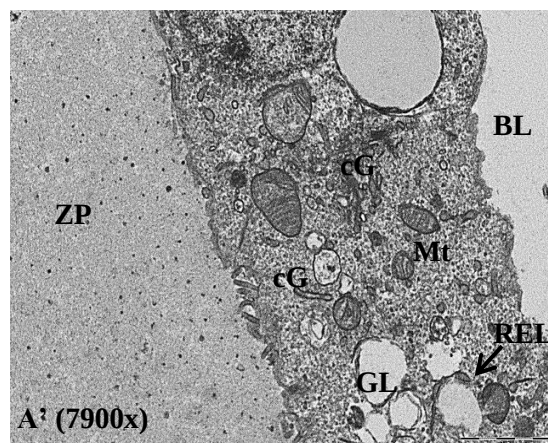
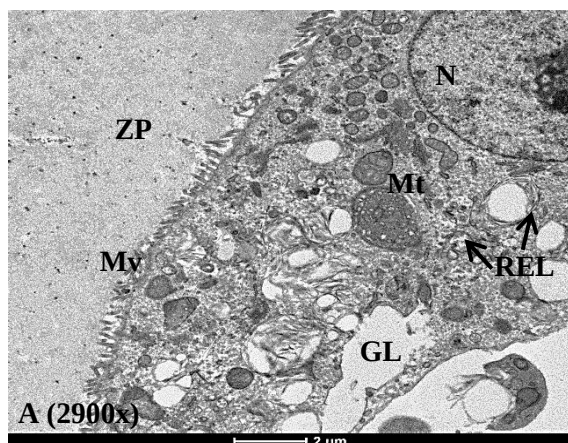


Figura 6: Avaliação em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de blastocistos PIV (D7) a partir de oócitos bloqueados por 6 horas com diferentes concentrações de forskolin na maturação e revertidos por 18 horas em meio livre de forskolin. Blastocistos do grupo Controle – **A:** presença de mitocôndrias (Mt), grânulos lipídicos (GL) e retículo endoplasmático liso (REL) associados. Observar a alta metabolização dos grânulos lipídicos (GL) e **A':** presença de vários complexos de Golgi (cG) e retículo endoplasmático liso (REL) pelo citoplasma. Blastocistos do grupo F 0,025 mM – **B:** observação de um citoplasma (Cit) evidente com as mitocôndrias (Mt) complexos de Golgi (cG), grânulos lipídicos (GL) e núcleo celular (N) e **B':** observação do núcleo celular (N), da zona pelúcida (ZP) bem dilatada e ausência de espaço perivitelínico (EP) e microvilosidades (Mv). Blastocistos do grupo F 0,05 mM – **C:** presença de mitocôndrias (Mt) com cristas incompletas e grânulos lipídicos (GL) em menores quantidades. Foi observada a presença de junções entre os blastômeros do tipo junções tight (coating) (JT) e **C':** presença de muitas microvilosidades (Mv) e complexo de Golgi (cG). Blastocistos do grupo F 0,1 mM – **D:** visualização das mitocôndrias (Mt) e grânulos lipídicos (GL) e **D':** além dos complexos de Golgi (cG), entre as células foi encontrada a junção densa (coating) (JD). BL: blastocele.

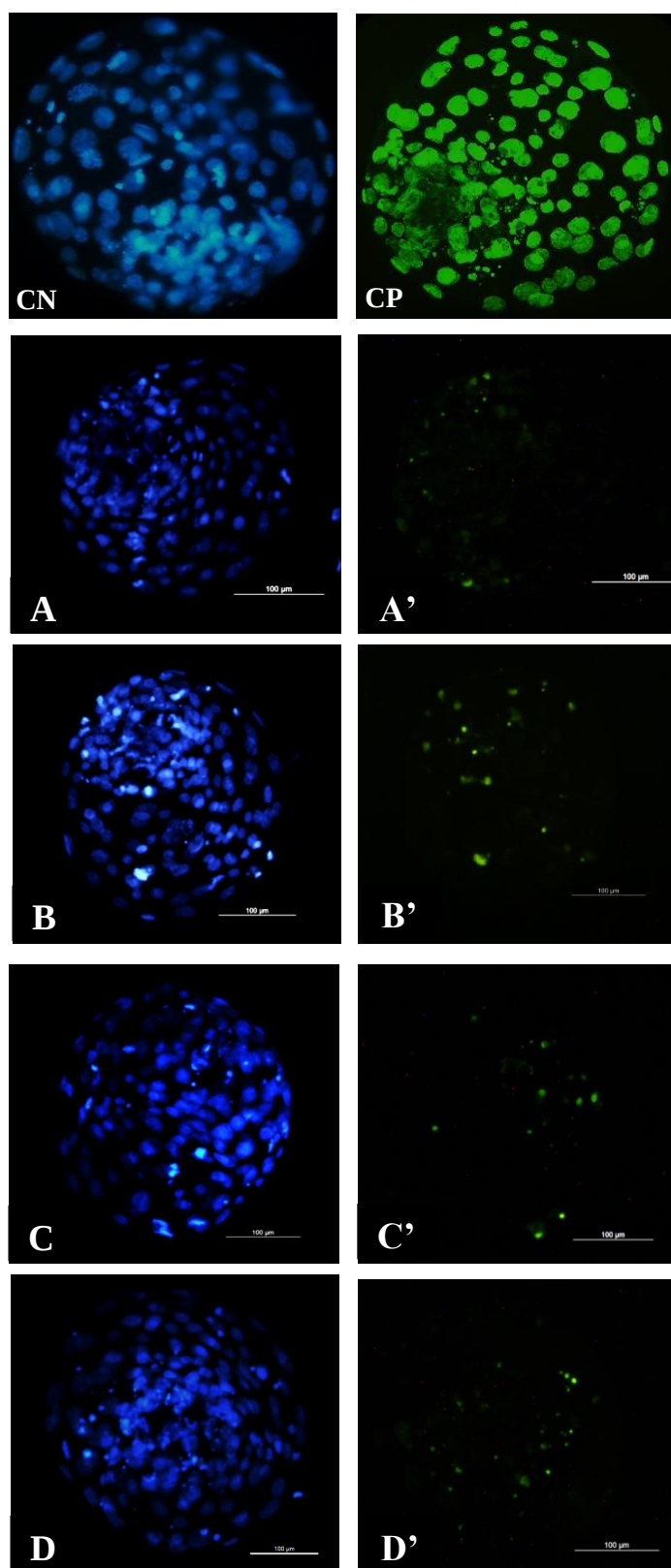


FIGURA 7: Embriões bovinos dos diferentes grupos submetidos à técnica TUNEL avaliados em microscópio de fluorescência invertido. **CN:** controle negativo da técnica; **CP:** controle positivo da técnica. **A e A':** grupo Controle; **B e B':** grupo F 0,025 mM; **C e C':** grupo F 0,05 mM; **D e D':** grupo F 0,1 mM. Coloração azul (Hoescht) representa o

número total de células íntegras. Coloração verde (FITC) indica o DNA fragmentado de células apoptóticas. Aumento de 400 x. Barra: 100 μm .

Capítulo 3

Trabalho a ser enviado para a revista “Livestock Science”

(Anexo 2)

Vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro* após lipólise química com forskolin

Daniela Martins Paschoal^{1*}, Rosiára Rosário Dias Maziero¹, Mateus José Sudano¹,
Midyan Daroz Guastali¹, Luis Eduardo Vergara¹, Letícia Ferrari Crocomo¹, João
Ferreira de Lima-Neto¹, Luis Carlos Oña Magalhães¹, Tatiana da Silva Rascado¹, Alício
Martins Jr.², Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga¹

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil.

²Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina
Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, Brasil.

*Autor para correspondência:

Daniela Martins Paschoal

Endereço: Rubião Jr. s/n, CEP: 18618-970, Botucatu/SP, Brasil

Universidade Estadual Paulista, UNESP/FMVZ, Departamento de Reprodução Animal
e Radiologia Veterinária

Fone/Fax: +55 14 3880 2119

e-mail: dmpaschoal@yahoo.com.br

RESUMO

A presença do soro fetal bovino (SFB) no meio de cultivo tem influenciado a qualidade embrionária causando uma redução na sobrevivência pós-criopreservação. O forskolin vem sendo utilizado para induzir a lipólise e aumentar a criotolerância, por ser um ativador da adenilato ciclase elevando os níveis de cAMP. No presente experimento, zigotos bovinos foram cultivados em meio SOFaa até o dia 6, quando foram divididos em quatro grupos para a adição do forskolin: Controle; 2,5 μ M; 5 μ M e 10 μ M, permanecendo por 24 horas em presença da droga. Foi verificada a taxa de formação de blastocistos, a quantificação dos grânulos de lipídios, a avaliação do número total de células e taxa de apoptose e em seguida os embriões foram vitrificados. Após o aquecimento foi avaliada a taxa de reexpansão, o número total de células e o índice de apoptose. Não foi observada diferença na taxa de formação de blastocisto, nem na taxa de reexpansão após a vitrificação. Por outro lado, todas as concentrações do forskolin apresentaram diferença sobre a quantificação lipídica ($P < 0,05$). Tanto o número de células quanto a taxa de apoptose em embriões frescos apresentaram diferença estatísticas ($P < 0,05$); enquanto que esse evento não ocorreu com os embriões após a vitrificação. Concluiu-se que o forskolin é um agente lipolítico eficiente mesmo em baixas concentrações (grupo F 2,5 μ M), levando a formação de blastocistos com um maior número de células quando comparado ao grupo controle. Após a vitrificação observou-se um efeito benéfico da lipólise química na reexpansão dos embriões e na redução da taxa de apoptose celular.

Palavras-chave: apoptose, blastocisto, criopreservação, forskolin, lipídio.

1. Introdução

Em 2011 o Brasil produziu 350.762 embriões bovinos sendo que 90,7% foram produzidos *in vitro* (PIV). Isso representa um aumento de 15,7% em relação ao total de embriões produzidos em 2010. O crescimento no total de embriões em 2011 pela PIV confirma que essa técnica além de substituir a transferência de embriões (TE) possibilitou a expansão do mercado nacional (Viana, 2012).

O recente crescimento no número de embriões produzidos no país está associado a importantes mudanças na atividade, que podem sinalizar o cenário das tecnologias de embriões para os próximos anos (Viana, 2012).

É aceitável que embriões PIV possuam qualidade inferior aos produzidos *in vivo*, pois as condições de PIV não conseguem simular perfeitamente o ambiente encontrado *in vivo* (Lonergan e Fair, 2008). O soro fetal bovino (SFB) ainda tem sido apontado como um dos principais responsáveis pelas diferenças morfológicas (Abe et al., 1999a; Dorland et al., 1994) e fisiológicas (Krisher et al., 1999; Rizos et al., 2003) em embriões PIV como por exemplo, o aumento no número e tamanho dos grânulos lipídicos (Abe e Hosh, 2003; Abe et al., 1999a, 1999b, 2002, 2004) o que influencia a qualidade embrionária (Ferguson e Leese, 1999; Sata et al., 1999), causando uma redução na sobrevivência pós-criopreservação (Abe et al., 2002; Mucci et al., 2006; Sudano et al., 2011). Entretanto, esse fator é conflitante, pois as vitaminas, ácidos graxos e fatores de crescimento encontrados no SFB, são essenciais para a compactação das mórulas e desenvolvimento dos blastocistos (Kane e Bavister, 1988).

A partir disso, o forskolin vem sendo utilizado em meios de cultivo para diminuir o conteúdo lipídico, por meio da lipólise química, aumentando a criotolerância e qualidade pós-vitrificação (Cuello et al., 2013; Kane e Bavister, 1988; Paschoal et al.,

2009, 2012a). O forskolin (7 β -acetoxi-8,13-expoxi-1 α ,6 β ,9 α -triidroxi-Labd-14-en-11-one, C₂₂H₃₄O₇), derivado da família dos dipertenos (Bilodeau-Goeseels, 2006; Seamon e Daly, 1981; Seamon et al., 1981) consiste num agente ativador da adenilato ciclase, que atua em células intactas e está relacionado aos níveis de cAMP, importante para as funções fisiológicas de vários sistemas (Arrese et al., 1999; Cuello et al., 2013; Ek et al., 1997; Ho e Shi, 1982; Men et al., 2006; Seamon et al., 1981).

A vitrificação tem sido considerada uma alternativa para a congelação (Men et al., 2006; Paschoal et al., 2012a), podendo ser utilizada rotineiramente tanto nos laboratórios de pesquisa como em fazendas (Campos-Chillòn et al., 2006), pois apresenta execução simples e é menos onerosa que a congelação (Ptak et al., 1999; Shaw et al., 1997) por ser realizada na ausência do aparelho de congelação. Por ser realizada em menor tempo, gera uma ausência na formação de cristais de gelos intracelulares, os quais são os principais causadores das crioinjúrias embrionárias (Okada et al., 2002). Com base nessas informações, esse trabalho possuiu o objetivo de induzir uma lipólise química adicionando o forskolin no sexto dia de cultivo embrionário, com o intuito de diminuir os grânulos lipídicos intracitoplasmáticos e assim, aumentar a taxa de sobrevivência após a criopreservação de embriões PIV.

2. Materiais e métodos

Todas as substâncias que foram utilizadas neste trabalho foram adquiridos da Sigma (Sigma-Aldrich[®], Corporation, St. Louis, MO), exceto para aquelas que são especificadas no texto.

2.1. Produção *in vitro* (PIV) de embriões

2.1.1. Coleta dos ovários e maturação *in vitro* (MIV)

Foram utilizados ovários de vacas Zebuínas de abatedouro comercial, transportados ao laboratório da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP/Botucatu. No laboratório, os ovários foram lavados com NaCl a 0,9% a uma temperatura de 37 a 38°C. Foram aspirados os folículos com diâmetro entre 2-8 mm com seringas de 10 mL e agulhas 40 x 12. Foram realizadas 8 réplicas utilizando 1.519 oócitos.

Após a seleção, os oócitos foram lavados e transferidos para gotas de MIV em Tissue Culture Medium – 199 (TCM 199[®], Gibco 11150-059, Grand Island, NY, USA) acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB[®], Gibco 12657-029, Grand Island, NY, USA), 0,011 g/mL de Piruvato de Sódio, 1 µg/µL de Hormônio Folículo Estimulante (FSH, Pluset[®], Hertape), 5 µg/µL de Hormônio Luteinizante (LH, Lutropin[®], Bioniche) e 16,6 µg/µL de Amicacina. Os oócitos permaneceram em estufa com 5% de CO₂ em ar, sob temperatura de 38,5°C e umidade absoluta durante 24 horas.

2.1.2. Fertilização *in vitro* (FIV)

Oócitos maturados de todos os grupos foram fertilizados *in vitro* (D 0 = FIV) com sêmen congelado de touro da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). O sêmen foi selecionado pelo gradiente Percoll (Parrish et al., 1995) sendo a concentração final

ajustada para 2×10^6 espermatozoides / mL. Os oócitos foram incubados durante 24 horas, em estufa com 5% de CO₂ em ar, sob temperatura de 38,5 °C e umidade absoluta.

Os oócitos foram fertilizados em Human Tubal Fluid (HTF[®], Irvine Scientific, Santa Ana, California, USA Irvine Scientific) acrescido de 5 mg/mL de Albumina Sérica Bovina (BSA, A-8806), 0,011 g/mL de Piruvato de Sódio, 0,5 mg/mL de Cafeína, 0,003 g/mL de Heparina, de 0,0003 g/mL de Penicilinamina, 0,00011 g/mL de Hipotaurina e 0,00018 g/mL de Epinefrina e 16,6 µg/µL de Amicacina.

2.1.3. Cultivo *in vitro* (CIV)

Os prováveis zigotos foram cultivados em meio Synthetic Oviductal Fluid mais aminoácidos (SOFaa – Holm et al., 1999) mais 2,7 mM de Mio-inositol, 0,2 mM de Piruvato de Sódio, 5 mg/mL de BSA (A-8806), 2,5% de SFB, e 16,6 µg/µL de Amicacina. Os embriões foram mantidos em estufa com 5% de CO₂, 5% de O₂, e 90% de N₂ sob temperatura de 38,5°C e umidade absoluta até o dia 6 (D 0 = FIV), momento o qual foram divididos em quatro grupos para a adição do Forskolin[®] (F-6886): **Controle** (grupo cultivado na ausência de forskolin, durante sete dias consecutivos); **F 2,5 µM** (grupo com 2,5 µM de forskolin, durante 24 horas); **F 5 µM** (grupo com 5 µM de forskolin, durante 24 horas); **F 10 µM** (grupo com 10 µM de forskolin, durante 24 horas).

Após 24 horas foi avaliada a taxa de formação de blastocisto para posteriormente vitrificá-los.

2.1.4. Avaliação do índice de apoptose

Após sete dias de CIV (D 0 = FIV) foi avaliado o índice de apoptose. Foram utilizados de 10 a 15 embriões de cada grupo experimental para a técnica TUNEL (Terminal deoxinucleotil transferase Uracil Nick End Labeling) que identifica *in situ*, a fragmentação internucleossômica do DNA, evento este resultante da apoptose. Esta avaliação foi realizada com o “*Kit in Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein*” (Roche® - 11 684 795 910, Mannheim, Alemanha).

Os embriões foram lavados em solução de lavagem (0,1% PVP/PBS) e fixados em solução fixadora (paraformaldeído a 4%) por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente foram permeabilizados em solução permeabilizadora (0,1% de triton X-100 e 0,1% citrato de sódio em PBS) por 1 hora em câmara úmida e temperatura ambiente. Para o controle positivo e controle negativo: os embriões foram incubados no controle positivo e negativo com a Solução de DNAase (Promega®, M6101, Madison, EUA) por 1 hora à 37°C (estufa) no escuro.

Após, o controle positivo as amostras foram incubados em gotas de 10 µL do MIX TUNEL em lâminas com coroa de esmalte por 1 hora a temperatura de 37 °C no escuro e em câmara úmida. O controle negativo foi incubado apenas com solução marcadora na ausência da solução enzimática para conferir a marcação.

Após serem lavados em solução de lavagem, controles e amostras foram submetidos a um contraste para visualização do DNA com solução de Hoechst 33342 (1 mg/mL) e glicerol em uma lâmina com lamínula e foram analisados em microscópio invertido de fluorescência. Com filtro de excitação de 450 a 490 nm e de emissão de 515 nm os núcleos fluorescentes em verde (isotiocianato de fluoresceína - FITC) foram considerados as células TUNEL positivas, ou seja, apresentaram o DNA fragmentado.

Com filtro de excitação de 365 nm e de emissão de 420 nm os núcleos fluorescentes em azul (Hoechst 33342) indicaram a presença e a localização do núcleo das células.

Para a contagem do número de células apoptóticas (coradas em verde) e número total de células (coloração azul) foi utilizado o programa Image J 1.41 (Wayne Rasband National Institutes of Health, Bethesda, EUA). Com base nestes dados, foi feito o cálculo da porcentagem de ocorrência da apoptose (número de células apoptóticas em relação ao número total de células do embrião).

2.1.5. Quantificação dos grânulos de lipídios

A análise do conteúdo lipídico foi realizada com o Sudan Black B (S-0395), onde os embriões frescos foram fixados em solução de 10% formalina em PBS com pH = 7,4 durante 2 horas em temperatura ambiente. A seguir foram lavados em água destilada com 0,05% PVA, e transferidos para gota de etanol 50% em água por 2 minutos. Foram corados em 1% de Sudan Black B (p/v) em etanol 70%. Em seguida foram lavados 3 vezes em etanol 50% e mais 5 minutos em 0,05% PVA em água destilada.

As lâminas foram montadas com gotas de glicerol, cobertas com lamínulas e avaliadas em microscópio de luz x 600. Para estimar o conteúdo lipídico dos embriões, foi realizada uma fotografia de cada grupo de blastocisto ($n = 10$) e submetida ao programa Image J 1.14 (Wayne Rasband National Institutes of Health, Bethesda, EUA). As colorações foram convertidas em escalas de cinza conforme Sudano et al. (2012a).

Os embriões foram delimitados para se obter a área (μm^2) e a média de intensidade cinza (unidades arbitrárias), e a intensidade de cinza por área foi calculada (unidades arbitrárias / μm^2). Devido a comparação do conteúdo de lipídios embrionários

ser realizada em termos de volume (μm^3), a quantidade de intensidade de cinza por área foi convertida em intensidade cinza por volume (unidades arbitrárias / μm^3) usando a fórmula de intensidade de cinza / volume (= intensidade cinza / área).

2.2. Vitrificação e aquecimento de embriões produzidos *in vitro* (PIV)

A vitrificação foi realizada com blastocistos (Bl) e blastocistos expandidos (Bx) (n = 259; Figura 1 G). Foi empregado o protocolo de Campos-Chillòn et al. (2006), com algumas modificações. Os embriões foram mantidos em meio base (MB) composto por Holding (Nutricell[®]) mais 0,1% (p/v) de polivinilpirrolidona (P-8136), sob temperatura de 38 a 38,5°C (Figura 1 A e B) até o momento da vitrificação. Em seguida foram expostos ao meio de vitrificação 1 (MV1) composto por 5 M de EG (E-9129) em meio base durante 3 minutos e transferidos para uma gota de 5 μL do meio de vitrificação 2 (MV2) composto por 7 M de EG, 0.5 M de galactose (G-0750) e 18% (p/v) de ficoll 70 (F-2878) em meio base.

Em seguida os embriões foram envasados em palhetas francesas estéreis de 0,25 mL (Nutricell[®]), com auxílio de uma seringa de 1 mL (Figura 1 C) as quais foram montadas da seguinte maneira: 1 cm de galactose (0.5 M em meio base), 0,5 cm de ar, 7 cm de galactose seguido de mais 0,5 cm de ar. Os embriões contidos no MV2 foram transferidos às palhetas (gota de 15 μL de MV2) seguidos de 0,5 cm de ar e completando-se com galactose até a extremidade da palheta. Os embriões foram envasados de dois a quatro por palheta (Figura 1 F).

O tempo de passagem dos embriões para o MV2, envasamento, selagem da palheta e de transferência ao vapor de N_2 líquido não ultrapassou 45 segundos. As

palhetas permaneceram em vapor de N₂ por 1 minuto (Figura 1 D) e em seguida foram transferidas verticalmente ao N₂ líquido (Figura 1 E).

Para o aquecimento, as palhetas foram mantidas em ar por 8 segundos e depois em água a 37°C por 15 segundos. Os embriões foram então lavados e cultivados em meio SOFaa contendo 10% de SFB durante 12 horas em estufa de 5% de CO₂, 5% de O₂, e 90% de N₂ para a avaliação da reexpansão embrionária (Figura 1 H e I). Em seguida à avaliação da taxa de reexpansão, os embriões também foram retirados aleatoriamente, para avaliação da viabilidade embrionária e da apoptose (n = 10 a 15), seguindo a mesma metodologia dos embriões frescos.

2.3. Análise Estatística

Para análise estatística os dados foram analisados utilizando a ANOVA através do PROC GLM do SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Fontes de variação no modelo incluindo tratamento e réplica foram considerados como efeito fixo e aleatório, respectivamente. Os dados são apresentados como média dos quadrados mínimos e erro padrão. Para todas as análises foi adotado o nível de significância de 5%.

3. Resultados

Foi observada uma similaridade na taxa total de formação de embriões no D 7 entre os grupos que passaram por lipólise química no D 6 (D 0 = FIV) com as três concentrações de forskolin e ao grupo Controle (Tabela 1). Entretanto, houve uma diferença significativa com o estágio de desenvolvimento embrionário, onde a concentração de 2,5 µM levou a um aumento na produção de embrião no estágio de Bl

enquanto e que a concentração de 5 μM levou um aumento na produção de embriões nos estágios de Bi e Bl (Tabela 1 – $P < 0,05$).

Em relação à quantificação lipídica, a menor dosagem do forskolin já foi eficiente em induzir a lipólise, se diferenciando do grupo Controle. Todas as dosagens do agente lipolítico foram significativamente diferentes entre si (Tabela 2 – $P < 0,05$; Figura 2).

Quanto aos embriões frescos, os quatro grupos apresentaram diferença estatística no número total de células, sendo que quando se adicionou a concentração 2,5 μM no meio de cultivo, o número de células no embrião aumentou (Tabela 4 – $P < 0,05$). Neste grupo também foi observada uma maior taxa de células apoptóticas em relação aos demais grupos (Tabela 4 – $P < 0,05$; Figura 3).

Após a vitrificação e aquecimento dos embriões, não foi observada diferença na taxa de reexpansão em nenhum grupo (Tabela 3). Da mesma forma, não houve diferença no número total de células e na taxa de apoptose entre os grupos após a vitrificação e aquecimento (Tabela 4).

Entretanto, quando foi comparado os grupos de embriões frescos com os grupos de embriões aquecidos, foi observado grandes diferenças entre o número total de células (com exceção do grupo F 5 μM) e entre a taxa de células em apoptose (Tabela 4 – $P < 0,05$; Figura 4).

4. Discussão

As técnicas de PIV levam a um aumento exponencial no número de embriões bovinos a cada ano (Plourde et al., 2012). Com o propósito de colaborar para a manutenção ou até mesmo para a superação destes dados, este experimento possuiu o

objetivo de produzir embriões bovinos seguidos de lipólise química com o forskolin para melhorar a sua qualidade (Cuello et al., 2013; Men et al., 2006; Paschoal et al., 2012a), viabilizando assim, protocolos de criopreservação. A diminuição no conteúdo lipídico é possível, pois esse agente induz a ativação do adenilato ciclase e estimula a cAMP, causando uma lise do triglicerídeo intracelular e consequentemente a metabolização do glicerol (Cuello et al., 2013).

Um dos propósitos do presente experimento foi testar qual a melhor dose do agente lipolítico sem causar degeneração ao embrião, uma vez que, na literatura, se encontra somente a concentração de 10 μM (Cuello et al., 2013; Men et al., 2006; Paschoal et al., 2012a). Para tanto, além dessa dose foi estabelecido utilizar 2,5 μM e 5 μM do forskolin.

Foi observada uma similaridade entre a taxa total de formação de blastocisto no sétimo dia de cultivo e essas taxas estão acima dos resultados encontrados na literatura (Dhali et al., 2011; Plourde et al., 2012). Quando se utilizou a concentração de 10 μM foram observados os mesmos resultados de nossos experimentos anteriores (Paschoal et al., 2010, 2011a, 2011b, 2011c, 2012a).

Nenhuma concentração do forskolin influenciou a formação de embriões, entretanto quando foram utilizadas as concentrações de 2,5 μM e 5 μM de forskolin, houve uma influencia no estágio de desenvolvimento embrionário, sendo observada uma alta taxa de Bi e principalmente de Bl nessas concentrações. Como a avaliação foi feita no D 7, esses resultados poderiam indicar um atraso no desenvolvimento embrionário. No entanto, não houve interferência no número total de blastocistos formados.

Barceló-Fimbres e Seidel Jr. 2007, utilizando o regulador metabólico etosulfato de fenazina (PES), com a finalidade de reduzir o conteúdo lipídico, também não encontraram diferenças quanto a produção de embriões PIV.

Para avaliar se o forskolin foi eficaz em diminuir a quantidade de grânulos lipídicos intracitoplasmático foi utilizado o corante lipofílico Sudan Black B. A partir dessa avaliação, todas as concentrações de forskolin utilizadas no experimento foram significativamente diferentes entre si e quanto menor a dosagem, maior foi sua eficiência em causar lipólise embrionária. Quando se comparou todos os tratamentos com o Controle, somente o grupo F 2,5 μM se diferenciou. Esse efeito demonstra que, em embriões frescos, a menor concentração do forskolin já foi capaz de diminuir o conteúdo lipídico, não sendo necessária a utilização de altas dosagens de drogas, que são indesejáveis aos meios e sistemas de cultivo *in vitro*.

No presente experimento foi observado um alto número de células íntegras nos embriões em comparação com a literatura (Plourde et al., 2012). Os grupos F 5 μM e F 10 μM se assemelharam ao grupo livre de forskolin (Controle), mas quando foi adicionada a menor concentração de forskolin (F 2,5 μM) a quantidade de células íntegras ultrapassou a quantidade do grupo Controle. Esses resultados concordam com experimentos anteriores (Paschoal et al., 2012a), onde a maior concentração do forskolin (10 μM) se assemelhou ao número de células do Controle. O contrário foi observado por Barceló-Fimbres e Seidel Jr. (2007) e Cuello et al. (2013) que não observaram diferenças no total de células íntegras entre seus grupos, quando utilizaram o PES e o forskolin, respectivamente para reduzir a quantidade lipídica.

Entretanto, a melhor forma para se avaliar a qualidade embrionária é por meio do índice de apoptose, onde uma alta incidência deste processo está associada com a redução da viabilidade embrionária (Byrne et al., 1999). A apoptose pode ser

quantificada por meio da reação TUNEL, que possibilita a detecção *in situ* de células apoptóticas, pela marcação da fragmentação oligonucleossomal do DNA geradas pela atividade de DNAases endógenas durante o processo de apoptose (Gjorret et al., 2003).

A partir dos resultados desse experimento, observou-se que na concentração de 2,5 μM a taxa de apoptose foi mais elevada. Este fato pode estar relacionado ao maior número de células apresentado por estes embriões, o qual foi significativamente superior aos demais grupos. A apoptose de células embrionárias tem recebido uma crescente atenção, devido principalmente ao seu papel em resposta às condições de subdesenvolvimento embrionário. Assim, o aumento da apoptose celular consiste num indicador de condições inadequadas de cultivos *in vitro* para oócitos (Kim et al., 2008). No entanto, a apoptose também é considerada um mecanismo endógeno de controle da remoção de células lesadas sendo benéfica para melhorar da qualidade embrionária (Byrne et al., 1999).

A maioria dos embriões bovinos obtidos *in vivo* é criopreservada pela técnica de congelamento tradicional (Palasz e Mapletoft, 1996), uma vez que esta possibilita resultado satisfatório (Rodrigues et al., 2007). Por outro lado, os melhores resultados obtidos após a criopreservação de embriões bovinos PIV são através da vitrificação (Mucci et al., 2006; Nedambale et al., 2004).

A partir de trabalhos prévios (Men et al., 2006; Nagashima et al., 2007; Somfai et al., 2009) observou-se que a vitrificação vem ganhando um papel importante com embriões PIV, mas sua eficiência com os mesmos ainda encontra-se preocupante (Cuello et al., 2013) em decorrência ao alto conteúdo lipídico. É bem provável que esse lipídio provenha do SFB dos meios de cultivo quimicamente indefinido, pois segundo Sudano et al. (2011) com a redução sérica nesses meios, o conteúdo lipídico diminuiu e, conseqüentemente aumentou a sobrevivência pós-criopreservação embrionária.

Neste contexto, o forskolin está sendo usado durante o cultivo *in vitro* de embriões para estimular a lipólise embrionária e aumentar a sobrevivência após a vitrificação e aquecimento (Cuello et al., 2013; Men et al., 2006; Paschoal et al., 2009, 2012a). O forskolin consiste num método alternativo para melhorar a taxas de PIV, reduzindo o conteúdo lipídico e melhorando a vitrificação dos embriões. Este agente induz potencialmente a ativação da adenilato ciclase. Essa enzima ativa uma lipase endógena através da cAMP e da proteína quinase, causando lipólise no triacilglicerol e liberação do glicerol (Cuello et al., 2013).

Após a vitrificação e aquecimento dos embriões PIV, não foram encontradas diferenças na reexpansão celular, indicando que o forskolin não prejudicou os embriões após esses processos. Essas taxas foram superiores às de Dhali et al., (2011) e semelhantes às encontradas na literatura (Park et al., 2006; Paschoal et al., 2010, 2011a, 2012a; 2012b). Quando Cuello et al. (2013) utilizaram 10 μ M de forskolin para induzir a lipólise química em embriões suínos, a sua taxa de reexpansão foi maior quando comparada com embriões livre de forskolin. Esse resultado é conflitante, uma vez que a quantidade de grânulos lipídicos presente em embriões PIV suínos é maior (Dobrinsky, 1997; Dobrinsky e Nagashima, 1999; Romek et al., 2009) que a encontrada em embriões PIV bovinos.

Cuello et al. (2013) quando compararam embriões frescos com embriões vitrificados e aquecido, observaram uma similaridade no número total de células, entretanto Dhali et al. (2011) obtiveram um maior número de células em embriões frescos quando comparados aos vitrificados (157 *versus* 130, respectivamente). Esses dados conferem com os do presente experimento, onde todos os grupos de embriões frescos, com exceção do grupo 5 μ M, possuíram um maior número de células íntegras que os grupos de embriões vitrificados.

Essa diminuição no número de células após a vitrificação é um evento bastante comum em embriões PIV, devido principalmente às crioinjúrias sofridas, além do mais os meios de vitrificação contém altas concentrações de crioprotetores que são altamente tóxicos, causando um desarranjo no citoesqueleto e no citoplasma celular e consequentemente no embrião como um todo.

Rios et al. (2010) obtiveram um maior número de células íntegras de embriões Bx quando comparados com Bl após a vitrificação, independente do volume de crioprotetor utilizado. Existe um conceito na literatura que embriões Bx possuem uma maior capacidade de resistência que embriões Bl após aquecimento (Varago et al., 2006). No presente experimento, apesar de utilizar esses dois estágios de blastocistos para vitrificação, não foi possível verificar qual dos dois responderam melhor ao processo pós-criopreservação.

Além do forskolin ter causado a lipólise química e de não ter tido diferença na taxa de reexpansão, todas as células íntegras apresentaram similaridade após serem aquecidas, independente da concentração do forskolin. Esse evento não ocorreu com as células dos embriões antes a vitrificação e superaram nossos resultados já publicados (Paschoal et al., 2011b, 2011c).

A vitrificação pode ser considerada uma potente causadora de danos físicos, químicos e térmicos os quais podem aumentar a apoptose em blastocisto (Sudano et al., 2011). A criotolerância e a taxa de apoptose são indicadores de qualidades de embriões PIV (George et al., 2008; Rizados et al., 2003). A queda da viabilidade embrionária após os processos de vitrificação e aquecimento ocorrem principalmente devido aos danos tóxicos dos crioprotetores que invadem a célula durante os processos de congelamento (Park et al., 2006).

Sudano et al. (2011) encontraram uma relação moderada entre o conteúdo lipídico celular e o aumento da apoptose em embriões vitrificados. No atual experimento, também foi observada uma relação moderada entre o conteúdo lipídico e a apoptose, onde a menor dose de forskolin (grupo F 2,5 μ M) causou um maior efeito lipolítico e sem causar danos apoptóticos nos embriões pós-aquecimento.

Nesse trabalho foi possível observar um aumento da apoptose após a vitrificação e aquecimento, quando se comparou embriões frescos com embriões aquecidos. Sudano et al. (2012b) também obtiveram um alto índice de apoptose em embriões que foram vitrificados (49,4%) em relação aos frescos (20,8%). Esses resultados também estão de acordo com outros autores na literatura (Márquez-Alvarado et al., 2004; Park et al., 2006).

Dhali et al. (2011), encontraram em seu experimento uma maior taxa de células em apoptose nos embriões que foram submetidos à vitrificação, entretanto num índice bem mais baixo que neste trabalho: 0,11% para os vitrificados e 0,08% para os frescos. Podemos justificar, pois Dhali et al. (2011) utilizaram apenas mórulas em três réplicas para vitrificar, enquanto que nesse experimento, foram utilizados Bl e Bx em oito réplicas.

Após mensurações do índice de apoptose, foi observado que antes da vitrificação alguns grupos sofreram apoptose e, após a vitrificação e aquecimento, todos os grupos mantiveram-se inalterados, ocorrendo uma semelhança entre os grupos Controle e tratamentos. Pode ser que além de causar a lipólise química, o forskolin seja capaz de manter ou até mesmo organizar a histoarquitetura do citoplasma embrionário após a criopreservação.

Novamente houve uma grande diferença entre embriões frescos e aquecidos, onde foi possível observar o aumento da taxa de apoptose após a vitrificação em todas

as concentrações do forskolin, inclusive no grupo Controle. Quando se avaliou a apoptose entre embriões frescos e vitrificados, foi observado que a taxa de células em apoptose praticamente dobrou em cada grupo experimental, isso comprova mais uma vez, o efeito deletério da vitrificação em embriões PIV, que são mais sensíveis que embriões produzidos *in vivo* frente à criopreservação, e que muitas vezes pode estar relacionado ao seu alto conteúdo lipídico.

5. Conclusão

O forskolin foi comprovado como eficiente agente lipolítico mesmo em baixas concentrações, levando a formação de blastocistos com um maior número de células quando comparado ao grupo controle.

Foi observada uma relação favorável entre o baixo conteúdo lipídico dos embriões vitrificados e sua taxa de apoptose, onde a menor concentração de forskolin (grupo F 2,5 μ M) causou um melhor efeito lipolítico sem influenciar na apoptose celular.

Referências

- Abe, H., Hosh, H., 2003. Evaluation of bovine embryo produced in high performance serum-free media. J. Reprod. Dev. 49,193-202.
- Abe, H., Otoi T, Tachikawa, S., Yamashita, S., Satoh, T., Hoshi, H., 1999a. Fine structure of bovine morulae and blastocysts *in vivo* and *in vitro*. Anat. Embryol. 199, 519-527.

- Abe, H., Shiku, H., Aoyagi, S., Hoshi, H. 2004. *In vitro* culture and evaluation of embryos for production of high quality bovine embryos. J. Mamm. Ova. Res, 21, 22-30.
- Abe, H., Yamashita, S., Itoh, T., Satoh, T., Hoshi, H. 1999b. Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro*-matured and -fertilized oocytes: Comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. Mol. Reprod. Dev. 53, 325-335.
- Abe, H., Yamashita, S., Satoh, T., Hoshi, H.. 2002. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. Mol. Reprod. Dev. 61, 57-66.
- Arrese, E.L., Matthew, T.F., Gizard, J.L., Wells, M.A., 1999. Calcium and cAMP are second messengers in the adipokinetic hormone-induced lipolysis of triacylglycerols in *Manduca sexta* fat body. J. Lipid Res. 40, 556-564.
- Barceló-Fimbres, M., Seidel, G.E., Jr., 2007. Effects of either glucose or fructose and metabolic regulators on bovine embryo development and lipid accumulation *in vitro*. Mol. Reprod. Dev. 74, 1406-1418.
- Beebe, L.F.S., Cameron, R.D.A., Blackshaw, A.W., Keates, H.L., 2005. Changes to porcine blastocyst vitrification methods and improved litter size after transfer. Theriogenology 64, 879-890.
- Bilodeau-Goeseels, S., 2006. Effects of culture media and energy sources on the inhibition of nuclear maturation in bovine oocytes. Theriogenology 66, 297-306.
- Byrne, A.T., Southgate, J., Brison, D.R., Leese, H.J., 1999. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. J. Reprod. Fertil. 117, 97-105.
- Campos-Chillón, L.F., Walker, D.J., Torre-Sanchez, J.F., Seidel, Jr. G.E., 2006. *In vitro* assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. Theriogenology 65, 1200-1214.

- Cuello, C., Gomis, J., Alminana, C., Maside, C., Sanchez-Osorio, J., Gil, M.A., Sánchez, A., Parrilla, J., Vazquez, J.M., Roca, J., Martinez, E.A., 2013. Effect of MEM vitamins and forskolin on embryo development and vitrification tolerance of *in vitro*-produced pig embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 136, 296-302.
- Dhali, A., Anchamparuthy, V.M., Butler, S.P., Mullarky, I.K., Pear-Son, R.E., Gwazdauskas, F.C., 2011. Development and quality of bovine embryos produced *in vitro* using growth factor supplemented serum-free system. *Open J. Animal Sci.* 1, 97-105.
- Dobrinsky, J.R., Nagashima, H., Pursel, V.G., Long, C.R., Johnson, L.A., 1999. Cryopreservation of swine embryos with reduced lipid content. *Theriogenology* 51, 164.
- Dobrinsky, J.R., 1997. Cryopreservation of pig embryos. *J. Reprod. Fertil.* 52(Suppl), 301-312.
- Dorland, M., Gardner, D.K., Trounson, A.O., 1994. Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 13, 70.
- Ek, I., Arner, P., Bergqvist, A., Carlström, K., Wahrenberg, H. 1997. Impaired adipocyte lipolysis in nonobese women with the polycystic ovary syndrome: a possible link to insulin resistance? *J. Clinical Endocrinology and Metabolism* 82, 1147-1153.
- Ferguson, E.M., Leese, H.J., 1999. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *J. Reprod. Fertil.* 116, 373-378.
- George, F., Daniaux, C., Genicot, G., Verhaeghe, B., Lambert, P., Donnay, I. 2008. Set up of a serum-free culture system for bovine embryos: embryo development and quality before and after transient transfer. *Theriogenology* 69, 612-623.
- Gjorret, J.O., Knijin, H.M., Dieleman, S.J., Avery, B., Larsson, L.I., Hyttel, M. 2003. Cronology of apoptosis in bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. *Biol. Reprod.* 69, 1193-1200.

- Ho, Ren-Jye, Shi, Qi-Huang. 1982. Forskolin as a novel lipolytic agent. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 107, 157.
- Holm, P., Booth, P.J., Schmidt, M.H., Greve, T., Callesen, H. 1999. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 52, 683-700.
- Kane, M.T., Bavister, B.D. ,1988. Vitamin requirements for development of eight-cell hamster embryos to hatching blastocysts *in vitro*. *Biol. Reprod.* 39, 1137-1143.
- Kim, Chi-Gu, Yong, H., Lee, G., Cho, J., 2008. Effect of the polyvinylpyrrolidone concentration of cryoprotectant on mouse embryo development and production of pups: 7.5% of PVP is beneficial for *in vitro* and *in vivo* development of frozen-thawed mouse embryos. *J. Reprod. Dev.* 54, 250-253.
- Krisher, R.L., Lane, M., Bavister, B.D., 1999. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biol. Reprod.* 60, 1345-1352.
- Lonergan, P., Fair, T., 2008. *In vitro*-produced bovine embryos-dealing with the warts. *Theriogenology* 69, 17-22.
- Márquez-Alvarado, Y.C., Galina, C.S., Castilla, B., León, H., Moreno-Mendoza, N. 2004. Evidence of damage in cryopreserved and fresh bovine embryos using the Tunel technique. *Reprod. Dom Anim.* 39, 141-145.
- Men, H., Agca, Y., Riley, L.K., Critser, J.K., 2006. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. *Theriogenology* 66, 2008-2016.

- Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G.G., Hozbor, F., Cabodevila, J., Alberio, R.H., 2006. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 65, 1551-1562.
- Nagashima, H., Hiruma, K., Saito, H., Tomii, R., Ueno, S., Nakayama, N., Matsunari, H., Kurome, M., 2007. Production of live piglets following cryopreservation of embryos derived from *in vitro*-matured oocytes. *Biol. Reprod.* 76, 900-905.
- Nedambale, T.L., Dinnyés, A., Groen, W., Dobrinsky, J.R., Tian, X.C., Yang, X., 2004. Comparasion on *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 64, 437-449.
- Okada, A., Yoshii, K., Mizuochi, Y., Andoh, T., Joujou, S., Wachi, S., Tagawa, M., Ishida, N., Asada, M. Fukui, Y., 2002. Viability of cryopreserved and vitrified embryos and fertility after direct transfer in ewes. *J. Reprod. Dev.* 48, 189-195.
- Palasz, A.T., Mapletoft, R.J., 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advances* 14, 127-149.
- Park, S.Y., Kim, E.Y., Cui, X.S., Tae, J.C., Lee, W.D., Kim, N.H., Park, S.E., Lim, J.H., 2006. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. *Zygote* 14, 125-131.
- Parrish, J.J., Krogenaes, A., Susko-Parrish, J.L., 1995. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* 44, 859-869.
- Paschoal, D.M., Sudano, M.J., Guastali, M.D., Maziero, D.R.R., Crocomo, L.F., Magalhães, L.C.O., Rascado, T.S., Martins, Jr., A., Landim-Alvarenga, F.C., 2012a. Forskolin effect on the cryosurvival of *in vitro*-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. *Zygote* 18, 1-12.

Paschoal, D.M., Sudano, M.J., Rascado, T.S., Magalhães, L.C.O., Crocomo, L.L., Lima-Neto, J.F., Guastali, M.D., Maziero, R.R.D., Martins, Jr., A., Landim-Alvarenga, F.C., 2012b. Vitrication of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus* embryos produced in the presence or absence of fetal calf serum (abstract). *Reprod. Fertil. Dev.* 24(1), 131-132.

Paschoal, D.M., Sudano, M.J., Rascado, T.S., Magalhães, L.C.O., Crocomo, L.L., Lima-Neto, J.F. Landim-Alvarenga, F.C., 2010. Forskolin induces an improvement in the quality of bovine IVP embryos destined to vitrication? (abstract). *Acta. Sci. Vet.* 38, 818.

Paschoal, D.M., Sudano, M.J., Rascado, T.S., Magalhães, L.C.O., Crocomo, L.L., Lima-Neto, J.F., Guastali, M.D., Maziero, R.R.D., Calegari, R.S., Martins, Jr., A., Landim-Alvarenga, F.C.,. 2011a. Forskolin effect on *in vitro*-produced bovine embryos after vitrication (abstract). *Biol. Reprod.* 85, 733.

Paschoal, D.M., Sudano, M.J., Rascado, T.S., Magalhães, L.C.O., Crocomo, L.L., Lima-Neto, J.F., Martins, Jr., A., Landim-Alvarenga, F.C., 2011b Comparison between *in vivo* and *in vitro* produced embryos with forskolin after vitrication (abstract). *Reprod. Fertil. Dev.* 23(1), 147.

Paschoal, D.M., Sudano, M.J., Rascado, T.S., Magalhães, L.C.O., Crocomo, L.L., Lima-Neto, J.F., Guastali, M.D., Maziero, R.R.D., Martins, Jr., A., Landim-Alvarenga, F.C., 2011c. Vitricação de embriões bovinos produzidos *in vitro* após lipólise química (abstract). *Acta. Sci. Vet.* 39, 460.

Paschoal, D.M., Sudano, M.J., Silva, A.O., Landim-Alvarenga, F.C., 2009. Development of *in vitro* produced bovine embryos in media with decreasing concentration of fetal calf serum (abstract). *Anim. Reprod.* 6, 273.

- Plourde, D., Vigneaultb, C., Laflamme, I., Blondin, P., Robert, C., 2012. Cellular and molecular characterization of the impact of laboratory setup on bovine *in vitro* embryo production. *Theriogenology* 77, 1767-1778.
- Ptak, G., Dattena, M., Loi, P., 1999. Ovum pick-up in sheep: efficiency of *in vitro* production, vitrification and birth offspring. *Theriogenology* 52, 1105-1114.
- Rios, G.L., Mucci, N.C., Kaiser, G.G., Alberio, R.H., 2010. Effect of container, vitrification volume and warming solution on cryosurvival of *in vitro*-produced bovine embryo. *Anim. Reprod. Sci.* 118, 19-24.
- Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Perez-Garnelo, S., Fuente, J., Boland, M.P., Lonergan, P., 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implication for blastocysts development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.* 68, 236-243.
- Rodrigues, C.A., Ayres, H., Ferreira, R.M., Teixeira, A.A., Baruselli, P.S., 2007. Taxa de concepção de embriões frescos e criopreservados transferidos em vacas holandesas de alta produção (abstract). *Acta. Sci.Vet.* 35, 1256.
- Romek, M., Gajda, B., Krzysztofowicz, E., Smorag, Z., 2009. Lipid content of non-cultured and cultured pig embryo. *Reprod. Domest. Anim.* 44, 24-32.
- Sata, R., Tsuji, H., Abe, H., Yamashita, S., Hoshi, H., 1999. Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum free and serum-containing medium during early embryonic development. *J. Reprod. Dev.* 45, 97-103.
- Seamon, K., Daly, J.W., 1981. Activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin does not require the guanine nucleotide regulatory protein. *The Journal of Biological Chemistry* 256, 9799-9801.

- Seamon, K.B., Padgett, W., Daly, J.W., 1981. Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 3363-3367.
- Shaw, J.M., Kuleshova, L.L., MacFarlane, D.R., Trounson, A.O., 1997. Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing Ficoll, PVP, or dextran. *Cryobiology* 35, 219-229.
- Somfai, T., Ozawa, M., Noguchi, J., Kaneko, H., Nakai, M., Maedomari, N., Ito, J., Kashiwazaki, N., Nagai, T., Kikuchi, K., 2009. Live piglets derived from *in vitro*-produced zygotes vitrified at the pronuclear stage. *Biol. Reprod.* 80, 42-49.
- Sudano, M.J., Paschoal, D.M., Rascado, T.S., Crocomo, L.F., Magalhães, L.C.O., Martins, Jr. A, Machado, R, Landim-Alvarenga, F.C., 2012b. Crucial surviving aspects for vitrified *in vitro*-produced bovine embryos. *Zygote* 11, 1-8.
- Sudano, M.J., Paschoal, D.M., Rascado, T.S., Magalhães, L.C.O., Crocomo, L.F., Lima-Neto, J.F., Landim-Alvarenga, F.C., 2011. Lipid content and apoptosis of *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology* 5, 1211-1220.
- Sudano, M.J., Santos, V.G., Tata, A., Ferreira, C.R., Paschoal, D.M., Machado, R., Buratini, Jr. J., Eberlin, M.N., Landim-Alvarenga, F.C., 2012a. Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus in vitro*- and *in vivo*-produced blastocysts. *Biol. Reprod.* 87(6), 1-11.
- Varago, F.C., Saliba, W.P., Alvim, M.T.T., Vasconcelos, A.B., Oliveira, C.H., Stahlberg, R., Lagares, M.A., 2006. Vitrification of *in vitro* produced zebu embryos. *Anim. Reprod.* 3, 353-358.
- Viana, J.H.V., 2012. Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em 2011: mudanças e tendências futuras. *O embrião* 51, 6-10.

Tabela 1: Produção de blastocistos avaliados no dia 7 com diferentes concentrações de forskolin adicionadas no dia 6 do cultivo. Total de 8 réplicas e 577 blastocistos (média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão).

Tratamentos	Total (N)		Produção de Blastocistos (%)					
	Oóc	Blast	Bi	Bl	Bx	Bn	Be	Total
Controle	445	170	$6,4 \pm 1,0^a$	$4,2 \pm 0,9^{ab}$	$23,0 \pm 3,7$	$1,2 \pm 1,7$	$1,8 \pm 0,6$	$37,0 \pm 4,0$
F 2,5 μ M	351	136	$1,8 \pm 1,0^b$	$5,6 \pm 0,9^b$	$25,8 \pm 3,7$	$2,7 \pm 1,7$	$1,6 \pm 0,6$	$38,6 \pm 4,0$
F 5 μ M	376	164	$5,8 \pm 1,0^a$	$4,8 \pm 0,9^{ab}$	$26,7 \pm 3,7$	$1,1 \pm 1,7$	$1,9 \pm 0,6$	$40,7 \pm 4,0$
F 10 μ M	337	107	$2,6 \pm 1,0^b$	$2,5 \pm 0,9^a$	$19,4 \pm 3,7$	$5,0 \pm 1,7$	$0,7 \pm 0,6$	$31,4 \pm 4,0$

Estágio de desenvolvimento embrionário avaliado no dia 7: Bi: blastocisto inicial; Bl: blastocisto; Bx: blastocisto expandido; Bn: blastocisto em eclosão; Be: blastocisto eclodido. ^{ab}Letras sobrescritas incomuns na mesma coluna diferem ($P < 0,05$).

Tabela 2: Conteúdo lipídico embrionário avaliado no dia 7 com diferentes concentrações de forskolin adicionadas no dia 6 do cultivo. Total de 8 réplicas e $n = 10$ por grupo (média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão).

Tratamentos	Intensidade de Cinza/Área	Intensidade de Cinza/Volume
	($\times 10^{-3} / \mu\text{m}^2$) no Embrião	($\times 10^{-3} / \mu\text{m}^3$) no Embrião
Controle	$136,8 \pm 2,2^{ab}$	$50,6 \pm 1,1^{ab}$
F 2,5 μ M	$128,5 \pm 2,2^c$	$46,2 \pm 1,1^c$
F 5 μ M	$135,6 \pm 2,3^b$	$49,9 \pm 1,2^b$
F 10 μ M	$142,7 \pm 2,4^a$	$53,9 \pm 1,2^a$

^{abc}Letras sobrescritas incomuns na mesma coluna diferem ($P < 0,05$).

Tabela 3: Taxa de reexpansão dos embriões que foram aquecidos (após vitrificação no dia 7), com diferentes concentrações de forskolin adicionadas no dia 6 do cultivo. Total de 8 réplicas e n = 259 (média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão).

Tratamentos	Total (n) de Embriões	Taxa de Reexpansão de
	Vitrificados	Embriões Aquecidos (%)
Controle	62	71,3 $\pm$ 8,9
F 2,5 μ M	69	73,1 $\pm$ 8,9
F 5 μ M	64	66,1 $\pm$ 8,9
F 10 μ M	64	89,0 $\pm$ 8,9

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$).

Tabela 4: Avaliação do número total de células íntegras e da taxa de apoptose de blastocistos frescos (dia 7) e aquecidos (pós vitrificação) com diferentes concentrações de forskolin adicionadas no dia 6 do cultivo. Total de 8 réplicas e n = 10 a 15 por grupo de embriões frescos e aquecidos (média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão).

Tratamentos	Número total de células íntegras		Taxa de células apoptóticas (%)	
	Embriões	Embriões	Embriões	Embriões
	Frescos	Aquecidos	Frescos	Aquecidos
Controle	140,1 $\pm$ 10,7 ^{acA}	104,1 $\pm$ 9,6 ^B	12,1 $\pm$ 3,5 ^{aA}	22,3 $\pm$ 3,1 ^B
F 2,5 μ M	173,5 $\pm$ 9,0 ^{bA}	101,3 $\pm$ 8,5 ^B	16,7 $\pm$ 4,1 ^{bA}	37,3 $\pm$ 3,8 ^B
F 5 μ M	120,6 $\pm$ 11,5 ^c	115,4 $\pm$ 11,5	11,1 $\pm$ 6,5 ^{aA}	33,2 $\pm$ 6,5 ^B
F 10 μ M	157,0 $\pm$ 13,9 ^{abA}	95,1 $\pm$ 11,3 ^B	14,2 $\pm$ 4,6 ^{abA}	30,3 $\pm$ 3,8 ^B

^{abc} Letras sobrescritas incomuns na mesma coluna diferem ($P < 0,05$).

^{AB} Letras sobrescritas incomuns na mesma linha diferem ($P < 0,05$).

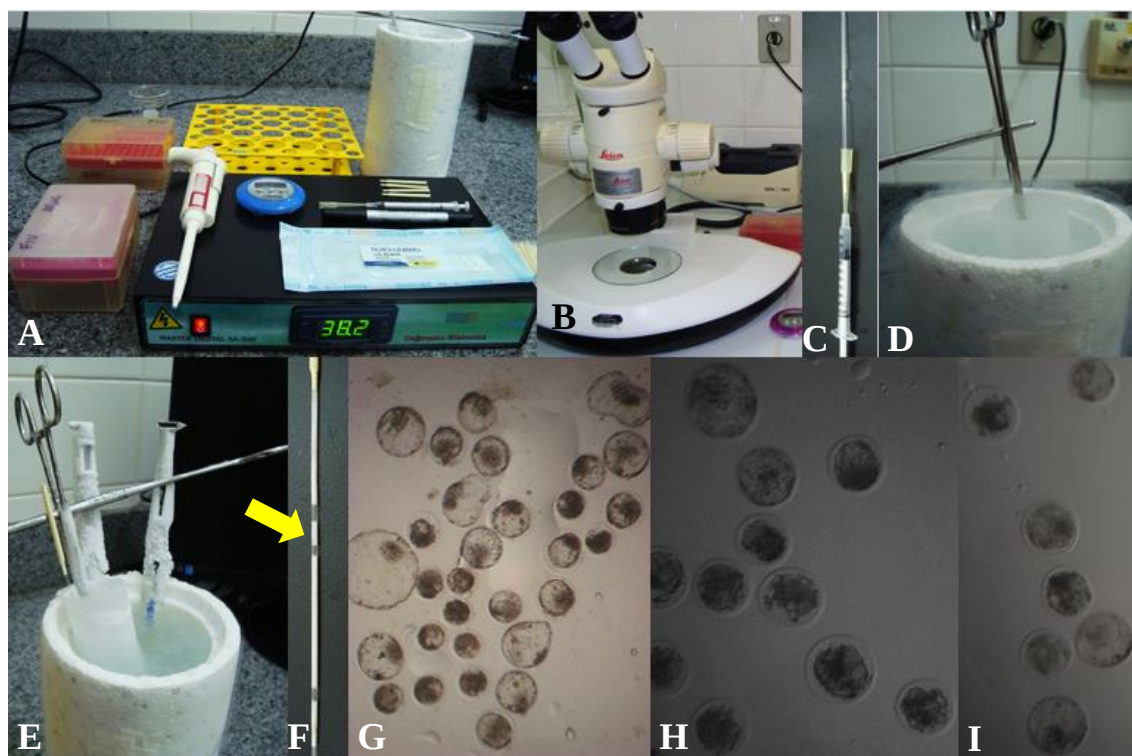


Figura 1: Representação dos processos de vitrificação. **A:** bancada contendo os equipamentos necessários: placa aquecedora com temperatura de 38°C, palhetas de 0,25 mL, lacres para palhetas, pipetadores com volume flexível, caixas de ponteiros, cronômetro, caneta permanente e seringas de 1 mL. **B:** estereomicroscópio. **C:** representação do encaixe da palheta de 0,25 mL na seringa de 1 mL para proceder a vitrificação. **D:** caixa de isopor com nitrogênio líquido a -196°C com um globete de plástico em seu vapor na espera da transferência da palheta. **E:** caixa de isopor com nitrogênio líquido a -196°C contendo a palheta dentro do globete de plástico. **F:** palheta francesa de 0,25 mL após sua retirada do N₂ líquido – flecha indica lugar de permanência do embrião mais o MV2. **G:** demonstração de embriões PIV frescos antes da vitrificação. **H** e **I:** demonstração de embriões PIV após serem vitrificados e aquecidos.

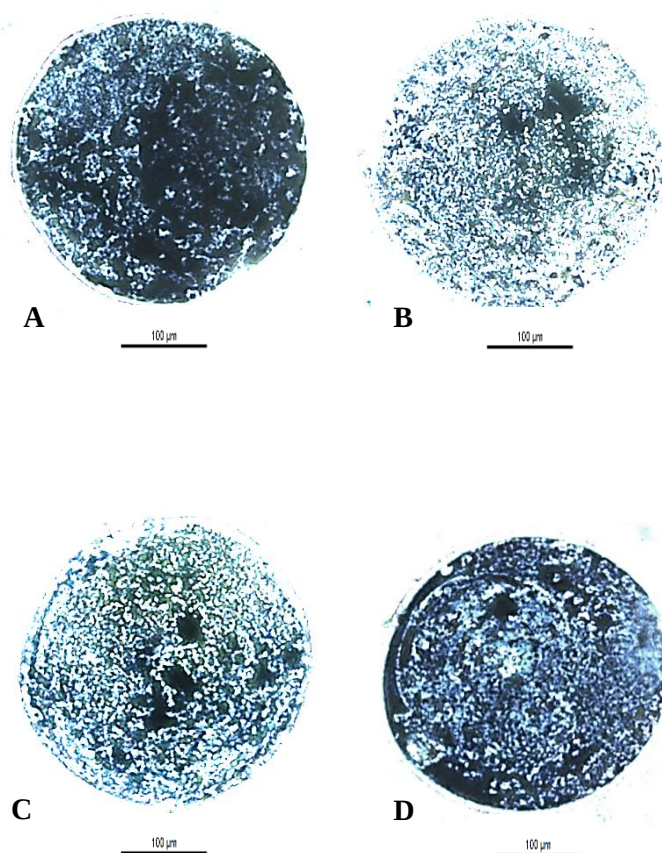


Figura 2: Embriões bovinos submetidos à técnica do corante lipofílico Sudan Black B. Pontos com coloração negra são referentes às gotas lipídicas citoplasmáticas. **A:** Grupo Controle; **B:** Grupo: F 2,5 µM; **C:** Grupo: F 5 µM; **D:** Grupo: F 10 µM. Aumento de x 400. Barra: 100 µm.

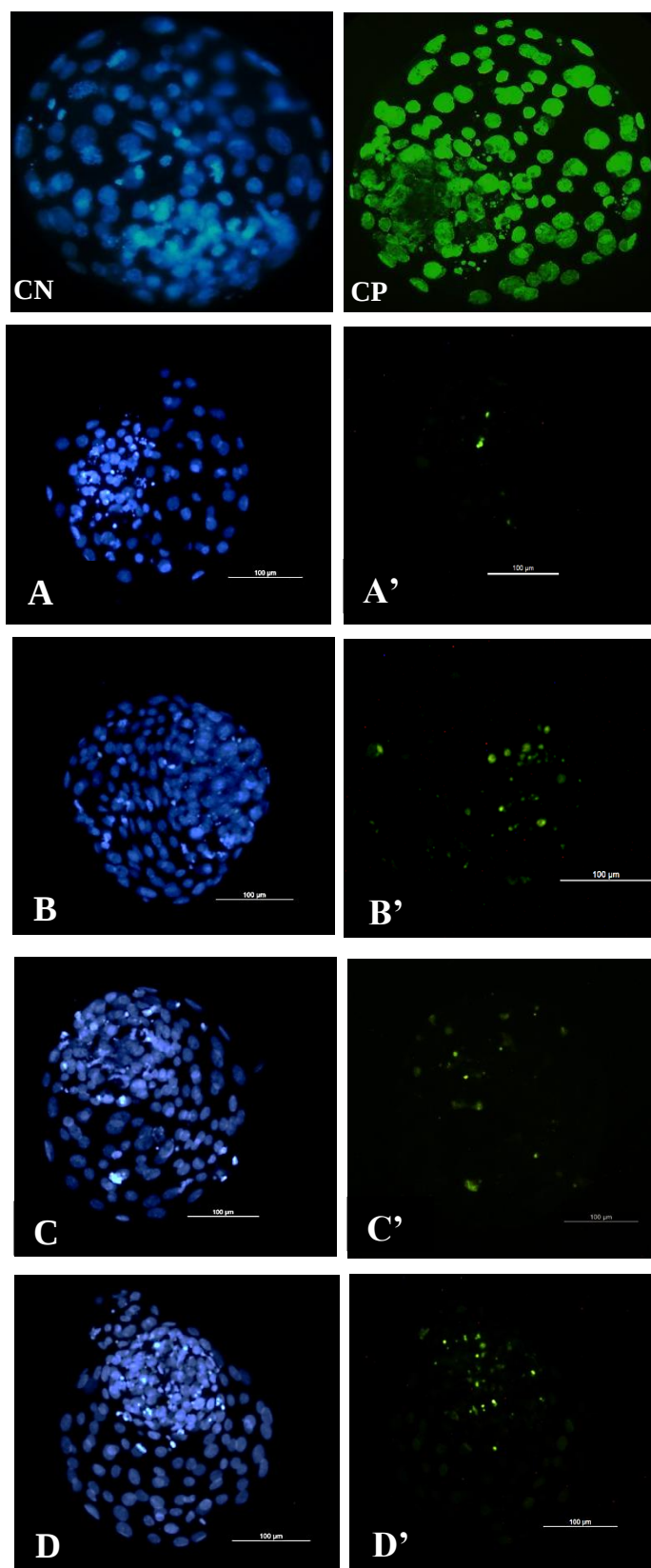


Figura 3: Embriões bovinos dos diferentes grupos submetidos à técnica TUNEL avaliados em microscópio invertido de fluorescência. **CN:** controle negativo da técnica; **CP:** controle positivo da técnica. **A e A':** grupo Controle; **B e B':** grupo F 2,5 μM ; **C e C':** grupo F 5 μM ; **D e D':** grupo F 10 μM . Coloração azul (Hoescht) representa o

número total de células íntegras. Coloração verde (FITC) indica o DNA fragmentado de células apoptóticas. Aumento de x 400. Barra: 100 μm .

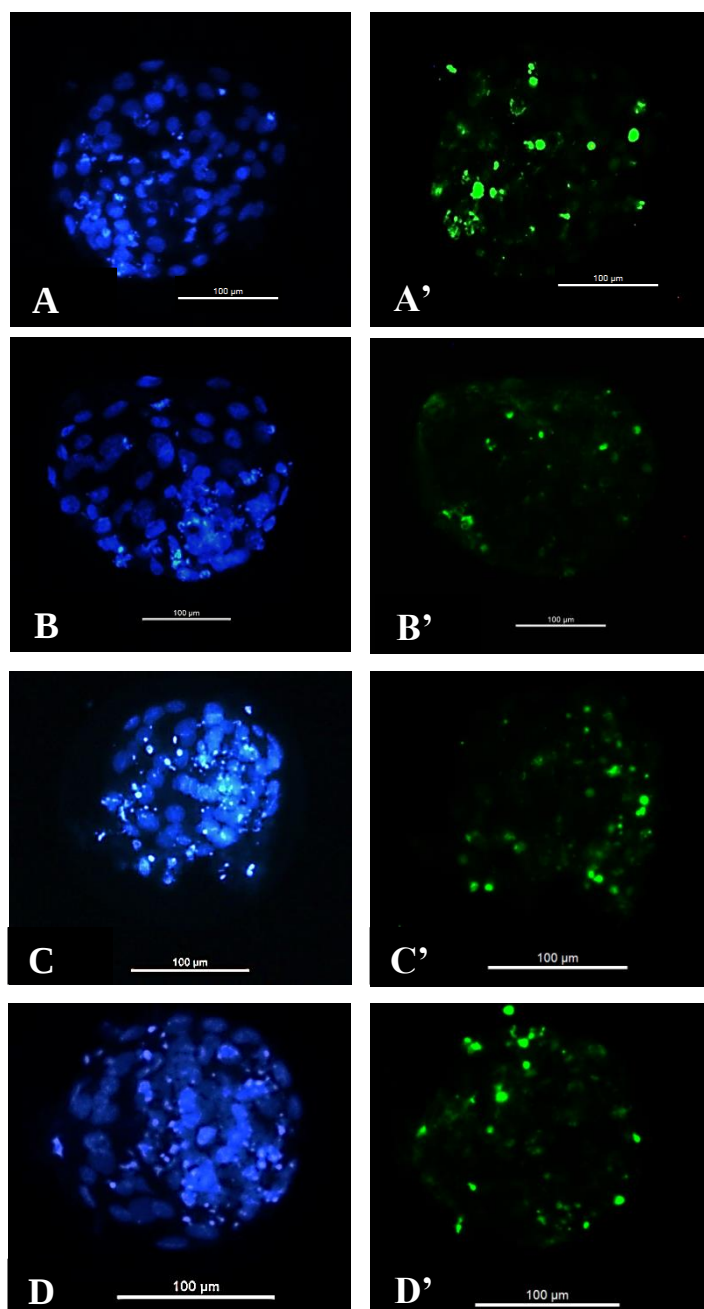


Figura 4: Embriões bovinos PIV dos diferentes grupos, após serem vitrificados e aquecidos, submetidos à técnica TUNEL avaliados em microscópio de fluorescência. **A** e **A'**: grupo Controle; **B** e **B'**: grupo F 2,5 µM; **C** e **C'**: grupo F 5 µM; **D** e **D'**: grupo F 10 µM. Coloração azul (Hoescht) representa o número total de células íntegras. Coloração verde (FITC) indica o DNA fragmentado de células apoptóticas. Aumento de x 400. Barra: 100 µm.

Capítulo 4

CONCLUSÕES GERAIS

Experimento I:

1- Quando foi testado somente o bloqueio meiótico com o forskolin, foi observada uma similaridade na resposta as doses, uma vez que independente da concentração utilizada, a maioria dos oócitos permaneceu em QVG ou em M I durante o período de tratamento.

2- Quando foi testado o bloqueio meiótico seguido da reversão, todas as concentrações utilizadas de forskolin foram eficientes em alcançar o estágio de M II.

3- Houve uma inter-relação entre maturação nuclear e citoplasmática na presença do forskolin, uma vez que os oócitos maturados na presença do forskolin, independente da concentração, alcançaram o estágio de M II sem prejudicar sua atividade respiratória mitocondrial.

4- Todas as concentrações de forskolin foram capazes de produzir embriões PIV, não afetando a taxa de blastocisto no D 7.

5- Foi verificado aumento da apoptose celular nos embriões PIV que foram tratados com a maior dose de forskolin na MIV, podendo ser confirmado por meio da microscopia eletrônica de transmissão.

Experimento II

1- Todas as concentrações de forskolin foram capazes de produzir embriões PIV, não afetando a taxa de blastocisto no D 7.

2- A menor concentração do forskolin (2,5 μ M) foi suficiente para diminuir o conteúdo lipídico de embriões bovinos.

3- A concentração de 5 μ M induziu o menor índice de morte celular programada em comparação aos demais grupos.

4- Após a vitrificação dos embriões PIV, não foram encontradas diferenças na reexpansão celular, no número total de células e no índice de apoptose, independente da concentração utilizada de forskolin.

5- Foi possível observar um aumento no número total de células e na porcentagem de apoptose quando se compara embriões frescos com embriões aquecidos.

6- Foi observada uma relação entre o conteúdo lipídico e a apoptose, onde a menor dose de forskolin foi capaz de gerar um maior efeito lipolítico, sem causar danos apoptóticos nos embriões pós-aquecimento.

BIBLIOGRAFIA

ABE, H.; OTOI, T.; TACHIKAWA, S.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Fine structure of bovine morulae and blastocysts *in vivo* and *in vitro*. **Anat Embryol**, v.199, p.519-527, 1999a.

ABE, H.; YAMASHITA, S.; ITOH, T.; SATOH, T.; HOSHI, H. Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro*-matured and -fertilized oocytes: Comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. **Molecular Reproduction and Development**, v.53, p.325-335, 1999b.

ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.57-66, 2002.

ABE, H.; SHIKU, H.; AOYAGI, S.; HOSHI, H. *In vitro* culture and evaluation of embryos for production of high quality bovine embryos. **J. Mamm. Ova. Res.**, v.21, p.22-30, 2004.

- ALBERTINI, D.F. Cytoplasmic microtubular dynamics and chromatin organization during mammalian oogenesis and oocyte maturation. **Mutat .Res**, v.296, p.57-68, 1992.
- ALBERTINI, D.F.; COMBELLES, C.M.; BENECHCHI, E.; CARABATSOS, M.J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v.121, p.647-653, 2001.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.1044-1045.
- AMBRUOSI, B.; LACALANDRA, G.M.; IORGA, A.I.; SANTIS, T.; MUGNIER, S.; MATARRESE, R.; GOUDET, G.; DELL'AQUILA, M.E. Cytoplasmic lipid droplets and mitochondrial distribution in equine oocytes: implications on oocyte maturation, fertilization and developmental competence after ICSI. **Theriogenology**, v.71, p.1093-1104, 2009.
- ANDREUCCETTI, P.; IODICE, M.; PRISCO, M.; GUALTIERI, R. Intercellular bridges between granulosa cells and the oocyte in the elasmobranch *Raja asterias*. **Anat. Rec.**, p.180-187, v.255, 1999.
- ARAV, A.; YAVIN, S.; ZERON, Y.; NATAN, D.; DEKEL, I.; GACITUA, H. New trends in gamete's cryopreservation. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.187, p.77-81, 2002.
- ARLOTTO, T.; SCHWATZ, J.L.; FIRST, N.L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L. Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.45, p.943-956, 1996.
- ARRESE, E.L.; MATTHEW, T.F.; GAZARD, J.L.; WELLS, M.A. Calcium and cAMP are second messengers in the adipokinetic hormone-induced lipolysis of triacylglycerols in *Manduca sexta* fat body. **J. Lipid Res.**, 40, 556-564, 1999.
- AVERY, B.; FAERGE, I.; HOLM, P. Confocal Microscopy of bovine oocytes and Roscovitine treated abattoir oocytes with emphasis on Mitochondria distribution and nuclear stage. **Theriogenology**, v.57, p.711, 2002.
- BARCELÓ-FIMBRES, M.; SEIDEL Jr., G.E. Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate an either glucose or fructose during *in vitro* culture of bovine embryos on embrionic development alter cryopreservation. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p.1395-1405, 2007.
- BEEBE, L.F.S.; CAMERON, R.D.A.; BLACKSHAW, A.W.; KEATES, H.L. Changes to porcine blastocyst vitrification methods and improved litter size after transfer. **Theriogenology**, v.64, p.879-890, 2005.

- BEITZ, D.C. Metabolismo dos Carboidratos; Metabolismo dos Lipídios. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. **Dukes: Fisiologia dos Animais Domésticos**, Guanabara Koogan, Cornell University Press: 1996. p.398-429.
- BETTS, D.H.; KING, W.A. Genetic regulation of embryo death and senescence. **Theriogenology**, v.55, p.171-191, 2001.
- BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; VAN DER HURK, R.; IZADYER, F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v.47, p.13-22, 1997.
- BILODEAU, S.; FORTIER, M.A.; SIRARD, M.A. Effect of adenylate cyclase stimulation on meiotic resumption and cyclic AMP content of zona-free and *cumulus*-enclosed bovine oocytes *in vitro*. **Journal Reproduction and Fertility**, v.97, p.5-11, 1993.
- 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.
- BILODEAU-GOESEELS, S. Effects of culture media and energy sources on the inhibition of nuclear maturation in bovine oocytes. **Theriogenology**, v.66, p.297-306, 2006.
- BILODEAU-GOESEELS, S. Effects of phosphodiesterase inhibitors on spontaneous nuclear maturation and cAMP concentrations in bovine oocytes. **Theriogenology**, v.60, p.1679-1690, 2003.
- BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.41, p.54-62, 1995.
- BREVINI, T.A.L.; VASSENA, R.; FRANCISCI, C.; GANDOLFI, F. Role of adenosine triphosphate, active mitochondria, and microtubules in the acquisition of developmental competence of parthenogenetically activated pig oocytes. **Biology of Reproduction**, v.72, p.1218-1223, 2005.
- BREVINI-GANDOLFI, T.A.; CILLO, S.; MODINE, S.; GANDOLFI, F. Defective developmental capacity of bovine oocytes is accompanied by a shorter poly(A) tail of maternal transcripts. **J. Reprod. Fertil. Abstr. Ser.**, p.41-42, 1997.
- BYRNE, A.T.; SOUTHGATE, J.; BRISON, D.R.; LEESE, H.J. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.117, p.97-105, 1999.

- CAMPBELL, M.K.; FARREL, S.O. **Bioquímica: Bioquímica metabólica**. 5ed. São Paulo: Thomson Learning, 2008. 845p.
- CAMPOS-CHILLÓN, L.F.; SUH T.K.; BARCELÓ-FIMBRES M.; SEIDEL JR., G.E.; CARNEVALE, E.M. Vitrification of early-stage bovine and equine embryos. **Theriogenology**, v.71 p.349-354, 2009.
- CAMPOS-CHILLÓN, L.F.; WALKER, D.J.; DE LA TORRE-SANCHEZ, J.F.; SEIDEL, Jr., G.E. *In vitro* assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. **Theriogenology**, v.65, p.1200-1214, 2006.
- CHO, S.K.; CHO, S.G.; BAE, I.H.; PARK, C.S.; KONG, I.K. Improvement in post-thaw viability of *in vitro*-produces bovine blastocysts vitrified by glass micropipette. **Animal Reproduction Science**, v.73, p.151-158, 2002.
- CHOI, Y.H.; LOVE, L.B.; VARNER, D.D.; HINRICHS, K. Holding immature equine oocytes in the absence of meiotic inhibitors: effect on germinal vesicle chromatin and blastocyst development after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology**, v.66, p.955-963, 2006.
- CRAN, D.G.; MOOR, R.M.; HAY, M.F. Fine structure of the sheep oocyte during antral follicle development. **J. Reprod. Fertil.**, v.59, p.125-132, 1980.
- CROMPTON, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. **Biochem. J.**, v.341, p.233-249, 1999.
- CROSIER, A.E.; FARIN, P.W.; DYKSTRA, M.J.; ALEXANDER, J.E.; FARIN, C.E. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.64, p.1375-1385, 2001.
- CUELLO, C.; GOMIS, J.; ALMINANA, C.; MASIDE, C.; SANCHEZ-OSORIO, J.; GIL, M.A.; SÁNCHEZ, A.; PARRILLA, J.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; MARTINEZ, E.A. Effect of MEM vitamins and forskolin on embryo development and vitrification tolerance of *in vitro*-produced pig embryos. **Animal Reproduction Science**, v.136, p.296-302, 2013.
- CUMMINS, J. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v.115(Suppl.1), p.S23-S29, 2004.
- CUMMINS, J.M.; WAKAYAMA, T.; YANAGIMACHI, R.; Fate of microinjected sperm components in the mouse oocyte and embryo. **Zygote**, v.5, p.301-308, 1997.
- DAVIDSON, E.H. Gene activity in early development. **Academic Press**, p.1-642, 1986.

- DOBRINSKY, J.R. Cellular approach to cryopreservation of embryo. **Theriogenology** v.45, p.17-26, 1996.
- DORLAND, M.; GARDNER, D.K.; TROUNSON, A.O. Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.13, p.70, 1994.
- EDWARDS, R.G. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. **Nature**, v.208, p.349-351, 1965.
- EK, I.; ARNER, P.; BERGQVIST, A.; CARLSTRÖM, K.; WAHRENBERG, H. Impaired adipocyte lipolysis in nonobese women with the polycystic ovary syndrome: a possible link to insulin resistance? **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.82, p.1147-1153, 1997.
- EPPIG, J.J. Maintenance of meiotic arrest and the induction of oocyte maturation in mouse oocyte-granulosa cell complexes developed *in vitro* from antral follicles. **Biology of Reproduction**, v.45, p.824-830, 1991.
- FAHERTY, S.; FITZGERALD, A.; KEOHAN, M.; QUINLAN, L.R. Self-renewal and differentiation of mouse embryonic stem cells as measured by Oct4 expression: the role of the cAMP/PKA pathway. **In vitro Cell. Dev. Biol. – Animal**, v.43, p.37-47, 2007.
- FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.203-216, 2003.
- FAIR, T.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; COTTELL, D.C.; HYTTEL, P.; WARD, F.A.; BOLAND, M.P. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. **Molecular Reproduction and Development**, v.58, p.186-195, 2001.
- FAN, H.Y.; SUN, Q.Y. Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. **Biology of Reproduction**, v.70, p.535-547, 2004.
- FERGUSON, E.M.; LEESE, H.J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.116, p.373-378, 1999.
- 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.

FULKA Jr., J.; FIRST, N.L.; MOOR, R.M. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. **Molecular Human Reproduction**, v.4, p.41-9, 1998.

GEORGE, F.; DANIAUX, C.; GENICOT, G.; VERHAEGHE, B.; LAMBERT, P.; DONNAY, I. Set up of a serum-free culture system for bovine embryos: Embryo development and quality before and after transient transfer. **Theriogenology**, v.69, p.612-623, 2008.

GILCHRIST, R. B. Interações oócitos-células do *cumulus* regulando a qualidade do oócito. **Acta Scientiae Veterinariae**, 36(Supl. 2): s257-s278, 2008.

GILCHRIST, R.B.; LANE, M.; THOMPSON, J.G. Oocyte secreted factors: regulators of *cumulus* cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, v.14, p.159-177, 2008.

GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.C. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potencial *in vitro*. **Theriogenology**, v.67, p.6-15, 2007.

GJORRET, J.O.; KNIJIN, H.M.; DIELEMAN, S.J.; AVERY, B.; LARSSON, L.I.; HYTTEL, M. Cronology of apoptosis un bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1193-1200, 2003.

GONÇALVES, P.B.D.; VISINTIN, J.A.; OLIVEIRA, M.A.L.; MONTAGNER, M.M.; COSTA, L.F.S. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREIDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, São Paulo: Varela Editora e Livraria LTDA, 2002. p.195-226.

GOTTARDI, F.P.; MINGOTI, G.Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução**, v.33, p.82-94, 2009.

GREEN, D.R.; REED, J.C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v.281, p.1309-1312, 1998.

GRIJALBA, M.T.; VERCESI, A.E.; SCHREIER, S. Ca^{2+} induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible step in the mechanism of Ca^{2+} stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. **Biochemistry**, v.38, p.13279-13287, 1999.

GUIGNOT, F.; BOUTTIER, A. BARIL, G.; SALVETTI, P.; PIGNON, P.; BECKERS, J.F.; TOUZÉ, J.L.; COGNIÉ, J.; TRALDI, Y.; MERMILLOD, P. Improved vitrification

method allowing direct transfer of goat embryos. **Theriogenology**, v.66, p.1004-1011, 2006.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 6.ed. São Paulo: Ed. Manole, 1995, 582p.

HALEY, S.A.; WESSEL, G.M. Regulated proteolysis by cortical granule serine protease 1 at fertilization. **Molecular and Cellular Biology**, v.15, p.2084-2092, 2004.

HARDY, K. Apoptosis in the human embryo. **Reviews of Reproduction**, v.4, p.125-134, 1999.

HARVEY, A.J.; KIND, K.L.; THOMPSON, J.G. Redox regulation of early embryo development. **Reproduction**, v.123, p.479-486, 2002.

HASLER, J.F.; HURTGEN, P.J.; JIN, Z.Q.; STOKES, J.E. Survival of IVF-derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. **Theriogenology**, v.46, p.563-579, 1997.

HO, REN-JYE; SHI, QI-HUANG. Forskolin as a novel lipolytic agent. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.107, p.157, 1982.

HOMA, S. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. **Molecular Reproduction and Development**, v.40, p.122-134, 1995.

HOMA, S.T. Effects of cyclic AMP on the spontaneous meiotic maturation of cumulus-free bovine oocytes cultured in chemically defined medium. **J. Exp. Zool.**, v.248, p.222-231, 1988.

HOSOE, M.; SHIOYA, Y. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. **Zygote**, v.5, p. 371-376, 1997.

HOTAMISLIGIL, S.; TONER, M. POWERS, R.D. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potencial of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. **Biology of Reproduction**, v.55, p.161-168, 1996.

HUANG, F.J.; CHANG, S.Y.; TSAI, M.Y.; LIN, Y.C.; KUNG, F.T.; WU, J.F.; LU, Y.J. Relationship of the human cumulus-free oocyte maturational profile with *in vitro* outcome parameters after intracytoplasmic sperm injection. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 16, p. 483-487, p. 1999.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capatation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23-32, 1997.

HYTTEL, P.; GREEVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 38, p. 35-47, 1989.

- HYTTEL, P.; VIUFF, D.; FAIR, T.; LAURINCIK, J.; THOMSEN, P.D.; CALLESEN, H.; VOS, P.L.A.M.; HENDRIKSEN, P.J.M.; DIELEMAN, S.J.; SCHELLANDER, K.; BESENFELDER, U.; GREVE, T. Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Reproduction**, v.122, p.21-30, 2001.
- JANSSENSWILLEN, C.; NAGY, Z.P.; VAN STEIRTEGHEM, A. Maturation of human cumulus-free germinal vesicle-stage oocytes to metaphase II by coculture with monolayer Vero cells. **Human Reproduction**, v. 10, p. 375-378, 1995.
- JONES KT, CARROLL J, MERRIMAN JA, WHITTINGHAM DG, KONO T. Repetitive sperm-induced Ca^{2+} transients in mouse oocytes are cell cycle-dependent. **Development**, v.121, p. 3259-3266, 1995.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 339p.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 427p.
- KANE, M.T.; BAVISTER, B.D. Vitamin requirements for development of eight-cell hamster embryos to hatching blastocysts *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.39, p.1137-1143, 1988.
- KASAI, M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.67-75, 1996.
- KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; ALM, H.; TORNER, H.; HELEIL, B.. TUCHSCHERER, A.; RYNSKA, B. Mitochondrial aggregation patterns and activity in *in vitro* cultured bovine oocytes recovered from early antral ovarian follicles. **Theriogenology**, v.75, p.662-670, 2011.
- KINNALLY, K.W.; ANTONSSON, B. A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP in apoptosis. **Apoptosis**, v.12, p.857-868, 2007.
- KLINE D. Attributes and dynamics of the endoplasmic reticulum in mammalian eggs. **Curr Top Dev Biol**, v.50, p.125-154, 2000.
- KRIEGER, C.; DUCHEN, M. Mitochondria, Ca^{2+} , and neurodegenerative disease. **Eur. J. Pharm.**, v.447, p.177-188, 2002.
- KRISHER, R.L. The effect of oocyte quality on development. **J. Anim. Sci.**, v.82(E-Suppl), p.14-23, 2004.
- KRISHER, R.L.; BAVISTER, B.D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, v.59, p.103-114, 1998.

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 oocytes, without influencing chromosome condensation. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 292-302, 2000.

KULESHOVA, L.L.; MacFARLANE, D.R.; TROUNSON, A.O.; SHAW, J.M. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. **Cryobiology**, v.38, p.119-130, 1999.

LAFONTAN, M.; BERLAN, M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. **Journal of Lipid Research**, v.34, p.1057-1091, 1993.

LANDIM-ALVARENGA, F.C. **Estudo da maturação nuclear, ultraestrutura e fertilização xenogênica de ovócitos equinos maturados *in vitro***. 2002. 180p.Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

LANDIM-ALVARENGA, F.C. Fecundação e clivagem. In: PRESTE, N.C.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. **Obstetrícia Veterinária**. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.1-21.

LANE, M.; GARDNER, D.K. Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. **Human Reproduction**, v.13, p.991-997, 1998.

LEQUARRE, A.S.; TRAVERSO, J.M.; MARCHANDISE, J.; DONNAY, I. Poly(A) RNA is reduced by half during bovine oocyte maturation but increases when meiotic arrest is maintained with CDK inhibitors. **Biology of Reproduction**, v.71, p.425-431, 2004.

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 III. **Molecular Reproduction and Development**, v.71, p.220-226, 2005.

LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.; ROBERTS, T.H.; HIRSHBERG, K. Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v.16, p.557-589. 2000.

MARQUES, M.G.; NICACIO, A.C.; OLIVEIRA, V.P.; NASCIMENTO, A.B.; CAETANO, H.V.A.; MENDES, C.M.; MELLO, M.R.B.; MILAZZOTTO, M.P.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A.; VISINTIN, J.A. *In vitro* maturation of pig oocytes with

diferente media, hormone and meiosis inhibitors. **Animal Reproduction Science**, v.97, p. 375-381, 2007.

MATHER, M.; HAGAI ROTTENBERG, H. Aging enhances the activation of the permeability transition pore in mitochondria. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.273, p.603-608, 2000.

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

McKIERNAN, S.H.; BAVISTER, B.D.; TASCA, R.J. Energy substrate requirements for in-vitro development of hamster 1- and 2-cell embryos to the blastocyst stage. **Human Reproduction**, v.6, p.64-75, 1991.

MEIRELLES, F.V.; CAETANO, A.R.; WATANABE, Y.F.; RIPAMONTE, P.; CARAMBULA, S.F.; MERIGHE, G.K. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.13-20, 2004.

MEN, H., ZHAO, C., SI, W., MURPHY, C.N., SPATE, L., LIU, Y., WALTERS, E.M., SAMUEL, M.S., PRATHER, R.S., CRITSER, J.K. Birth of piglets from *in vitro*-produced, zona-intact porcine embryos vitrified in a closed system. **Theriogenology**, p.76, p.280-289, 2011.

MEN, H.; AGCA, Y.; RILEY, L.K.; CRITSER, J.K. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. **Theriogenology**, v.66, p.2008-2016, 2006.

MERMILLOD, P.; DALBIÈS-TRAN, R.; UZBEKOVA, S.; THÉLIE, A.; TRAVERSO, J.M.; PERREAU, C.; PAPILLIER, P.; MONGET, P. Factors affecting oocyte quality: who is driving the follicle? **Reproduction in Domestic Animal**, v.43(Suppl. 2), p.393-400, 2008.

MOOR, M.R.; KRUIP, T.A.M.; GREEN, D. Selective effect of gonadotrophins on cell coupling, nuclear maturation and protein synthesis in mammalian oocytes. **J. Embryol. Exp. Morphol.**, v.61, p.347-365, 1981.

MORENO RD, SCHATTEN G, RAMALHO-SANTOS J. Golgi apparatus dynamics during mouse oocyte *in vitro* maturation: effect of the membrane trafficking inhibitor brefeldin A. **Biology of Reproduction**, v.66, p.1259-1266, 2002.

MUCCI, N.; ALLER, J.; KAISER, G.G.; HOZBOR, F.; CABODEVILA, J.; ALBERIO, R.H. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development

and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v.65, p.1551-1562, 2006.

NAGAI, S.; MABUCHI, T.; HIRATA, S.; SHODA, T.; KASAI, T.; YOKOTA, S.; SHITARA, H.; YONEKAWA, H.; HOSHI, K. Correlation of abnormal mitochondrial distribution in mouse oocytes with reduced developmental competence. **Tohoku J. Exp. Med.**, v.210, p.137-144, 2006.

NAGASHIMA, H.; KASHIWAZAKI, N.; ASHMAN, R.J.; GRUPEN, C.G.; ROBERT, SEAMARK, R. F.; NOTTLE, M.B. Removal of Cytoplasmic Lipid Enhances the Tolerance of Porcine Embryos to Chilling. **Biology of Reproduction**, v.51, p.618-622, 1994.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975p.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4.ed. New York: WH Freeman and Company, 2005. 237p.

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, v.35, p.109-124, 1991.

NISHI, Y.; TAKESHITA, T.; SATO, K.; ARAKI, T. Change of the mitochondrial distribution in mouse ooplasm during *in vitro* maturation. **J. Nippon Med. Sch.**, v.70, p.408-415, 2003.

NOHL, H.; GILLE, L.; STANIEK, K. Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. **Biochem. Pharmacol.**, v.69, p.719-723, 2005.

OHBOSHI, S. Cryopreservation of mammalian embryos by vitrification. **Anim. Sci. Technol.**, v.69, p.1069-1077, 1998.

OKADA, A.; YOSHII, K.; MIZUOCHI, Y.; ANDOH, T.; JOUJOU, S.; WACHI, S.; TAGAWA, M.; ISHIDA, N.; ASADA, M.; FUKUI, Y. Viability of cryopreserved and vitrified embryos and fertility after direct transfer in ewes. **Journal of Reproduction and Development**, v.48, p.189-195, 2002.

O'NEIL, L.; PAYNTER, S.; FULLER, B.; SHAW, R. Vitrification of mature mouse oocytes: improved results following addition of polyethylene glycol to a dimethyl sulfoxide solution. **Cryobiology**, v.34, p.295-301, 1997.

PALASZ, A. T.; MAPLETOFT, R. J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. **Biotechnology Advances**, v.14, p.127-149, 1996.

PARONE, P.A.; JAMES, D.; MARTINOU, J.C. Mitochondria: regulating the inevitable. **Biochimie**, v.84, p.105-111, 2002.

- PASCHOAL, D.M.; SUDANO, M.J.; GUASTALI, M.D.; MAZIERO, D.R.R.; CROCOMO, L.F.; MAGALHÃES, L.C.O.; RASCADO T.S.; MARTINS Jr., A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Forskolin effect on the cryosurvival of *in vitro*-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. **Zygote**, v.18, p.1-12, 2012.
- PASCHOAL, D.M.; SUDANO, M.J.; GUASTALI, M.D.; MAZIERO, D.R.R.; CROCOMO, L.F.; MAGALHÃES, L.C.O.; RASCADO T.S.; MARTINS Jr., A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Forskolin effect on the cryosurvival of *in vitro*-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. **Zygote**, v.18, p.1-12, 2012.
- PASCHOAL, D.M.; SUDANO, M.J.; SILVA, A.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Development of *in vitro* produced bovine embryos in media with decreasing concentration of fetal calf serum (abstract). **Animal of Reproduction**, v.6 p.273, 2009.
- PAYNE, C.; SCHATTEN, G. Golgi dynamics during meiosis are distinct from mitosis and are coupled to endoplasmic reticulum dynamics until fertilization. **Dev. Biol.**, v.264, p.50-63, 2003.
- PAYNTON, B.V.; BACHVAROVA, R. Changes in maternal RNAs during oocyte maturation. In: BAVISTER, B. D.; CUMMINS, J.; ROLDAN, E. R. S. **Fertilization in mammals**. Norwell: Serono Symposia, p.25-34, 1990.
- PINYOPUMMINTR, T.; BAVISTER, B.D. *In vitro*-matured/*in vitro*-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. **Biology of Reproduction**, v.45, p.736-742, 1991.
- PONTES, J.H.; MELO STERZA, F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES, B.V.; RUBIN, K.C.; SENEDA, M.M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v.75, p.1640-1646, 2011.
- PTAK, G.; DATTENA, M.; LOI, P. Ovum pick-up in sheep: efficiency of *in vitro* production, vitrification and birth offspring. **Theriogenology**, v.52, p.1105-1114, 1999.
- RACOWSKY, C. Effect of forskolin on the spontaneous maturation and cyclic AMP content of rat oocyte-cumulus complexes. **Journal Reproduction and Fertility**, v.72, p.107-116, 1984.
- RAYOS, A.A.; TAKAHASHI, Y.; HISHINUMA, M.; KANAGAWA, H. Quick freezing of unfertilized mouse oocytes using ethylene glycol with saccharose or trehalose. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.100, p.123-129, 1994.

- REYNAUD, K.; NOGUEIRA, D.; CORTVRINDT, R.; KURZAWA, R.; SMITZ, J. Confocal microscopy: principles and applications to the field of reproductive biology. **Folia Histochemica et Cytobiologia**, v.39, p.75-85, 2001.
- REYNIER, P.; MAY-PANLOUP, P.; CHRÉTIEN, M.F.; MORGAN, C.J.; JEAN, M.; SAVAGNER, F.; BARRIÈRE, P.; MALTHIÈRY, Y. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v.7, p.425-429, 2001.
- RICHARD, F.J.; SIRARD, M.A. Effects of follicular cells on oocyte maturation II: Theca cells inhibition of bovine oocyte maturation *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.54, p.22-28, 1996.
- RIOS, G.L.; MUCCI, N.C.; KAISER, G.G.; ALBERIO, R.H. Effect of container, vitrification volume and warming solution on cryosurvival of *in vitro*-produced bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v.118, p.19-24, 2010.
- RIZOS, D.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; PÉREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biology of Reproduction**, v.68, p.236-243, 2003.
- RODBELL, M. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. **Nature**, v.284, p.17-22, 1980.
- RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção *in vitro* de embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.229-233, 2007.
- SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, v.141, p.1-19, 2011.
- SATA, R.; TSUJI, H.; ABE, H.; YAMASHITA, S.; HOSHI, H. Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum free and serum-containing medium during early embryonic development. **Journal of Reproduction and Development**, v. 45, p. 97-103, 1999.
- SATHANANTHAN, A H. Ultrastructural changes during meiotic maturation in mammalian oocytes: unique aspects of the human oocyte. **Microsc. Res. Tech.**, v.27, p.145-164, 1994.
- SCHULTZ, R.M. Molecular aspects of mammalian oocyte growth and maturation. In: ROSSANT, J.; PEDERSEN, R.A. **Experimental approaches to mammalian embryonic development**. London: Cambridge University Press, 1986, p.195-237.

SEAMON, K.; DALY, J.W. Activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin does not require the guanine nucleotide regulatory protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v.256, p.9799-9801, 1981.

SEAMON, K.B.; PADGETT, W.; DALY, J.W. Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.78, p.3363-3367, 1981.

SHARMA, K.; WANG, R.X.; ZHANG, L.Y.; YIN, D.L.; LUO, X.Y.; SOLOMON, J.C.; JIANG, R.F.; MARKOS, K.; DAVIDSON, W.; SCOTT, D.W.; SHI, Y.F. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. **Pharmacology and Therapeutics**, v.88, p.333-347, 2000.

SHAW, J.M.; KULESHOVA, L.L.; MacFARLANE, D.R.; TROUNSON, A.O. Vitrication properties of solutions of ethylene glycol in saline containing Ficoll, PVP, or dextran. **Cryobiology**, v.35, p.219-229, 1997.

SIRARD, M.A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v.55, p.1241-1254, 2001.

SIRARD, M.A. Temporary inhibition of meiosis resumption *in vitro* by adenylate cyclase stimulation in immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v.33, p.757-767, 1990.

SIRARD, M.A.; FIRST, N.L. *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. **Biology of Reproduction**, v.39, p.229-234, 1988.

SOMFAI, T.; OZAWA, M.; NOGUCHI, J.; KANEKO, H.; NAKAI, M.; MAEDOMARI, N.; ITO, J.; KASHIWAZAKI, N.; NAGAI, T.; KIKUCHI, K. Live piglets derived from *in vitro*-produced zygotes vitrified at the pronuclear stage. **Biology of Reproduction**, v.80, p.42-49, 2009.

SOMMERFELD, V.; NIEMANN, H. Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrication. **Cryobiology**, v.38, p.95-105, 1999.

ST JOHN, J.C. The transmission of mitochondrial DNA following assisted reproductive techniques. **Theriogenology**, v.57, p.109-123, 2002.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S.A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONCALVES, 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.

STRICKER, S.A. Structural reorganization of the endoplasmic reticulum during egg maturation and fertilization. **Sem. Cell. Dev. Biol.**, v.17, p.303-313, 2006.

STROUD, B. Statistics and data retrieval committee report. **IETS 2012**, 2012.

STURMEY, R.G.; O'TOOLE, P.J.; LEESE, H.J. Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial:lipid association in the porcine oocyte. **Reproduction**, v.132, p.829-837, 2006.

SUDANO, M.J.; PASCHOAL, D.M.; MAZIERO, R.R.D.; RASCADO, T.S.; GUASTALI, M.D.; CROCOMO, L.F.; MAGALHÃES, L.C.O.; MONTEIRO, B.A.; MARTINS Jr., A.; MACHADO, R.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Improving postcryopreservation curvival capacity: an embryo approach. **Animal Reproduction**, v.10, 2013, in press.

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

SUN, Q.Y.; WU, G.M.; LAI, L.; PARK, K.W.; CABOT, R.; CHEONG, H.T.; DAY, B.N.; PRATHER, R.S.; SCHATTEEN, H. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development *in vitro*. **Reproduction**, v.122, p.155-163, 2001.

SZELL, A.; SHELTON, J.N. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.78, p.699-703, 1986.

TAKAHASHI, K.; MUKAIDA, T.; TOMIYAMA, T.; GOTO, T.; OKA, C. GnRH antagonist improved blastocyst quality and pregnancy outcome after multiple failures of IVF/ICSI with a GnRH agonist protocol. **J. Assist. Reprod. Genet.**, v.21, p.317-322, 2004.

TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; NAUWYNCK, H.; CORYN, M.; DE KRUIF, A.: Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.414-424, 2002.

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

- THIBAULT, C.; SZOLLOZI, D.; GERARD, M. Mammalian oocyte maturation. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.27, p.865-896, 1987.
- THOMAS, R.E.; ARMSTRONG, D.T.; GILCHRIST, R.B. Differential effects of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on bovine oocyte meiotic maturation. **Dev. Biol.**, v.244, p.215-225, 2002.
- THOUAS, G.A.; TROUNSON, A.O.; WOLVETANG, E.J.; JONES, G.M. Mitochondrial dysfunction in mouse oocytes results in preimplantation embryo *arrest in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1936-1942, 2004.
- TODOROV, I.; BERNARD, A.G.; McGRATH, J.J.; FULLER, B.J.; SHAW, R.W. Studies on 2,3 butanediol as a cryoprotectant for mouse oocytes: use of saccharose to avoid damage during exposure or removal. **Cryo Letters**, v.14, p.37-42, 1993.
- TOMEK, W.; TORNER, H.; KANITZ, W. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes *in vitro*. **Reproduction in Domestic Animals**, v.37, p.86-91, 2002.
- TORNER, H.; BRÜSSOW, K.P.; ALM, H.; RATKY, J.; PÖHLAND, R.; TUCHSCHERER, A.; KANITZ, W. Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of pre-ovulatory maturation. **Theriogenology**, v.61, p.1675-1689, 2004.
- VAJTA, G., HOLM, P., KUWAYAMA, M., BOOTH, P.J., JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction Development**, v.51, p.53-58, 1998.
- VAN BLERKOM, J. Microtubule mediation of cytoplasmic and nuclear maturation during the early stages of resumed meiosis in cultured mouse oocytes. **Proceedings National Academy of Sciences USA**, v.88, p.5031-5035, 1991.
- VAN BLERKOM, J.; DAVIS, P.; ALEXANDER, S. Inner mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$), cytoplasmic ATP content and free Ca^{2+} levels in metaphase II mouse oocytes. **Hum. Reprod.**, v.18, p.2429-2440, 2003.
- VIANA, J.H.V. Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em 2011: mudanças e tendências futuras. **O Embrião**, v.51, p.6-10, 2012.
- VORONINA, E.; WESSEL, G. M. The regulation of oocyte maturation. **Cur. Top. In Dev. Biol.**, v.58, p.53-110, 2003.

- WANG, J.; LÜ, Y.Y. Mitochondrial DNA 4977-bp deletion correlated with reactive oxygen species production and manganese superoxide dismutase expression in gastric tumor cells. **Chin. Med. J.**, v.122, p.431-436, 2009.
- WESSEL, G.M.; BROOKS, J.M.; GREEN, E.; HALEY, S.; VORONINA, E.; WONG, J.; Zaydfudim, V.; Conner, S. The biology of cortical granules. **Int. Rev. Cytol.**, v.209, p.117-206, 2001.
- WHITTINGHAM, D.C.; LEIBO S.P.; MAZUR, P. Survival of mouse embryo frozen to -196°C and 269°C. **Science**, v.178, p.411-414, 1972.
- WILDING, M.; DALE, B.; MARINO, M.; DI MATTEO, L.; ALVIGGI, C.; PISATURO, M.L.; LOMBARDI, L.; DE PLACIDO, G. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. **Human Reproduction**, v.16, p.909-917, 2001.
- WOLFE, J.; BRYANT, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **Int. J. Refrig.**, v.24, p.438-450, 2001.
- WOLFE, J.; BRYANT, G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. **Cryobiology**, v.39, p.103-129, 1999.
- WU, D.; CHEUNG, Q.C.; WEN, L.; LI, J. A growth-maturation system that enhances the meiotic and developmental competence of porcine oocytes isolated from small follicles. **Biology of Reproduction**, v. 75, p. 547-554, 2006.

Anexos

Anexo 1: Normas para publicação na *Reproduction in Domestic Animals*

ISSN: 1439-0531

1. General

Reproduction in Domestic Animals is an international journal publishing original, significant articles on reproduction in domestic animals, laboratory animals, and wildlife, with particular attention to basic, applied and clinical research. Reproduction is considered in a broad context, with its strong disciplinary, comparative core. The journal therefore covers obstetrics, neonatology and udder health, and welcomes contributions in these areas. The scope of the journal applies to veterinarians, breeders, and biologists while also being of interest to practitioners of human medicine. *Reproduction in Domestic Animals* is the official organ of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR), and the Spanish Society of Animal Reproduction (AERA).

We encourage the submission of topical results for publication as original papers, reviews (mini-reviews or critical feature articles), or short communications (including case reports and technical notes). Note that *Reproduction in Domestic Animals* only publishes well-written papers of high scientific quality and significance for the advancement of the field of reproduction, despite they being scientifically sound or properly executed or written. Feature articles or reviews should overview known information or tackle controversial issues in a particular area of the above-mentioned fields that comprise the scope of the journal, with the aim of founding future innovative research. Letters to the Editor, viewpoint articles and comments on published papers are also welcomed. Comments should be confined to the substance of the paper and the authors of the paper referred to will be offered the opportunity to respond. The journal publishes ONLINE-only preliminary communications of results that are of current and extreme interest. Authors interested in preparing a review, a feature article, or a viewpoint article, are invited to discuss the matter with the Editor-in-Chief. Such preliminary contact with the Editor-in-Chief is also advisable when Patent-related matters are included in any manuscript. All papers are subjected to a thorough peer-

review by at least two ad-hoc peer referees. Short communications will be subject to accelerated, but very strict refereeing. The publication language is English.

Short communications will be subject to accelerated, but very strict refereeing. Short Communications are available online only under its respective volume and issue at www.wileyonlinelibrary.com/journal/rda. The quality of articles and the standards for publication remain the same whether papers are published both print and online, or online-only.

The publication language is English.

2. Manuscript submission

The submission and review process of *Reproduction in Domestic Animals* is solely handled online at <http://mc.manuscriptcentral.com/rda>. To submit an article to *Reproduction in Domestic Animals*, please go to <http://mc.manuscriptcentral.com/rda>, create an account and submit your article. Complete instructions on how to submit a paper are available online at the Journal website [wileyonlinelibrary.com/journal/rda](http://www.wileyonlinelibrary.com/journal/rda). Please note that it is compulsory to include all authors with their affiliation and valid email addresses.

Please see that the corresponding author's complete address and a valid email are also present in the manuscript.

2.1. Licence to publish

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreement (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright-License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

2.2. Authorship and Acknowledgements

Authorship: Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript has been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal.

Reproduction in Domestic Animals adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE, authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

Upon submission of the manuscript, it is required that all authors be accredited as appropriate. During the online submission process, the corresponding author will be asked to submit a short description of each individual's contribution to the research and its publication. Upon submission of a manuscript all co-authors must also be registered with correct e-mail addresses. If any of the e-mail addresses supplied are missing or incorrect, the manuscript shall not be processed pending contact with the corresponding author.

Acknowledgements: Authors must acknowledge individuals who do not qualify as authors but who contributed to the research presented. Authors must acknowledge any assistance that they have received (e.g. provision of writing assistance, literature searching, data analysis, administrative support, supply of materials), describing if and how this assistance was funded and included with other funding information. The acknowledgements should be brief and not include thanks to anonymous referees and editors. Where scientists are acknowledged, a covering letter demonstrating their consent must be provided.

Conflict of interest: A subheading "Conflict of interest statement" must be placed at the end of the manuscript text (following acknowledgements), where all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately bias or influence their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, or direct or indirect funding.

Funding sources: All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should state this clearly.

Use of non-commercially available instrumentation, substances, antibodies or assays: When these had been kindly provided by any research group or company, an appropriate letter from them **MUST** be provided alongside the manuscript at submission (upload it as a well identified supplementary file).

3. Manuscript Requirements

3.1. Format

The manuscript must be typed (Times, font 12) with double spacing throughout and with a margin of at least 3 cm on the left-hand side. Lines must be numbered in a consecutive manner starting on the first page, in the left-hand margin. All pages of the manuscript must also be numbered consecutively, including those containing references, tables, and captions to illustrations, all of which are to be placed after the text. Illustrations, both line drawings and photographs, are to be numbered as figures in a

common sequence. The text should be prepared using standard software (Microsoft Word), doc; do not use automated or manual hyphenation.

On page one of the manuscript the official name of the institution, the place where the work was carried out, the title of the article, and the names of authors must be stated as follows: Town, Country (no mailing address); Title of Article; Name A, Name B, and Name C. The title should be concise and appropriately informative and should contain all keywords necessary to facilitate retrieval by modern search techniques. Additional keywords not already contained in the title or contents (abstract, summary) may be listed beneath the contents. An abridged title suitable for use as a running head at the top of the printed page and not exceeding 50 letters and spaces should also be supplied. Each original paper, review or short communication shall contain a short contents (abstract, summary), preferably less than 250 words. The contents should not just recapitulate the results but should state concisely the scope of the work and give the principal findings, avoiding acronyms and references. The contents shall be complete enough for direct use by abstracting services.

Original articles should be structured in the following order: Title, Contents, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgment and References. Placement of figures and tables should be indicated in the text. The experimental design should be described in sufficient detail (methods, analyses, statistics, breeds, origin, and management of animals etc.) to allow for repetition of the experiments.

If the paper is one of a numbered series, a reference to the previous part should be given as a footnote on the first page. If a part not yet published needs to be consulted for a proper understanding of the paper, an electronic copy of that manuscript should be supplied to assist the referees. The corresponding author postal and a functional e-mail address must appear at the end of the paper. Sets of identical data should not be given in tables and figures. Figures and tables should be accompanied by a legend.

The manuscript comprises a printout of the text, figures, tables, and a list of all figures and tables with their captions and titles on a separate piece of paper. We ask that you convey the essential information within the first 60 characters of the captions to accommodate the online edition. Each figure, table, and bibliographic entry must have a reference in the text. For all figures please include reproduceable artwork (marked with the author's name, short title, and figure number). Please do not import the figures into the text file.

3.2. Length

Original papers and review articles, including figures, tables and references, should not exceed 5,000 words. Short Communications (case reports and technical notes), should not exceed 1,800 words, including figures, tables and references. The number of figures and tables should be kept to a minimum. Extended data sets can be published online as supplementary material and should be identified as such.

3.3. Units, abbreviations and nomenclature

All specifications must be stated according to the S.I. System. Concentrations of chemical solutions are to be given in mol/l. All other concentrations should be given in % (volume or weight). All products implemented are to be mentioned with the manufacturer's name and delivery address which should appear in a footnote on the same page.

Any abbreviations of chemical, biological, medical, or other terms should only be employed when it is certain that they are internationally known. The full name must be stated in brackets when the abbreviation is first used.

All biological, medical, chemical, or other terms should be used according to the most recent recommendations of respective international nomenclature. Enzymes should be given according to the Enzyme Nomenclature (Elsevier Publishing Co., 1965). In the case of commercially obtained substances or reagents, the name and address of the manufacturer or supplier should be given as a footnote, when they are first mentioned in the text. Products (preparations etc.) with a registered trademark should be marked with ®. When non-commercially available substances or reagents are used, the following text must be provided: “[kindly provided by (name of the person plus the research group address or company name and location) and the corresponding date]”

Bacterial names should be in accordance with the latest edition of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (The Williams and Wilkins Co., Baltimore). Viruses are to be given the classification and names recommended by the International Committee on the Nomenclature of Viruses.

3.4. Illustrations and tables

Original Photographs or drawings must be sharp and of high contrast. Figures should be saved in a neutral data format such as TIFF or EPS, and a printout should

always be included. Powerpoint and Word graphics are unsuitable for good quality reproduction. Please do not use any pixel-oriented programmes. Scanned figures (only in TIFF format) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size. Please note that figures will generally be reduced to fit within the column-width or the print area. This means that numbering and lettering must still be readable when reduced (e.g. maps) and that the scale might not correspond with the original (microscopic pictures), thereby invalidating references to scale in the text. If artwork is to be scanned, line drawings should only be contour drawings without halftones (shades of grey). Please do not use patterns; rough hatching is possible. Graphs with an x and y axis should not be enclosed in frames; only 2-dimensional representations. Do not forget the labels and units. Captions for the figures should give a precise description of the content and should not be repeated within the figure.

Please submit the data for figures in black and white. However, colour photos can be reproduced in black and white (with a possible loss of contrast). Colour graphics should be created using the RGB mode. There is a charge for alterations to figures when carried out by the publisher. Figures printed in colour are subject to an added charge. In the event that an author is not able to cover the costs of reproducing colour figures our figures in colour in the printed version of the journal, *Reproduction in Domestic Animals* offers authors the opportunity to reproduce colour figures in colour for free in the online version of the article (but they will still appear in black and white in the print version). If an author wishes to take advantage of this free colour-on-the-web service, they should liaise with the Editorial Office to ensure that the appropriate documentation is completed for the Publisher. Colour print charges are explained on the Colour Work Agreement Form. Once completed, please return the form to:

Customer Services (OPI), John Wiley & Sons Ltd, European Distribution Centre, New Era Estate, Oldlands Way, Bognor Regis, West Sussex, PO22 9NQ

Scanned or faxed copies will not be accepted. Please direct queries to the Production Editor atrda@wiley.com.

Tables should be created using the table function.

3.5. References

In the text, citations are listed chronologically by the author and date and are not numbered. All citations in the text must be listed at the end of the paper, according to

the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors established in 1979. References should be listed in alphabetical order of the first author's name and all the authors should be listed.

The following are examples of the styles required for citing a book chapter, a journal article, and an entire book. For conference proceedings, be sure to include the name(s) of the editor(s) of the proceedings, the publisher and the place of publication.

Ewald C, Apel G, von Mickwitz G, 1988: Erfahrungen mit der Vakzination gegen die Haemophilus-Pleuropneumanie der Stewing. Berl Münch Tierärztl Wschr 102, 6-11.

Mair A, Diebschlag W, Distl O, Kräußlich W, 1988: Analysis of pressure distribution on the foot soles of cattle. J Vet Med A 35, 696-704.

Niemann H, Elsaesser F, 1983: Steroid hormones in early pig embryo development. In: Bavister BD (ed), The Mammalian preimplantation Embryo. Plenum Press New York, pp. 117-132.

Citations in the text should be given by placing in parenthesis the name(s) of author(s) and the year of publication, e.g. (Thein and Härtl 1986), (Ewald et al. 1988), (Mair et al. 1988; Nieman and Elsaesser 1983).

All entries in the reference list must correspond to citations in the text. No editorial responsibility can be taken for the accuracy of the references, and authors are requested to check these with special care. Papers that have not been accepted for publication are not to be included in the list of references and must be cited either as 'unpublished data' or as 'personal communication'. The use of such citations is discouraged. It is the author's responsibility to ensure that they have permission to cite material as a personal communication.

3.6. Laboratory animals

Papers reporting work with animals should include a reference to the code of practice adopted for the experimentation. Editors will take account of ethical and animal welfare issues and reserve the right not to publish.

4. Proof correction and offprints

When you receive proofs of your article, please check, correct, and return them electronically to the Editor-in-Chief without delay (within 3 days of receipt), as e-annotated proofs. As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors.

5. Book reviews

Book reviews appear irregularly at the end of the journals. Books submitted for review are sent by the editors to a scientist involved in the special research area. No fee is paid for reviews, but the review copy of the book (either as hard copy or electronic copy) remains the property of the reviewer. Each review should begin with exact bibliographical data on the publication, according to the following pattern:

Author(s) and/or editor(s), publication title, subtitle, edition, title of the publication series (and possibly its editors) in which the book has appeared, publisher, place of publication, year of publication, number of pages, number of illustrations, tables, and diagrams, cover material (e.g. paperback, quarter cloth binding etc.), retail price. Example:

Immelmann, F.: Introduction to Animal Behaviour. Revised and extended 3rd edition. Pareys Studentexte No. 13. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg. 1983. 223 pp., 106 figs., Balacron paperback, Euro 28.0.

Anexo 2: Normas para publicação na Livestock Science

ISSN: 1871-1413

Introduction

Types of article

1. Original Research Articles (Regular Papers); 2. Review Articles; 3. Short Communications; 4. Position Papers; 5. Technical Notes; 6. Book Reviews.

Original Research Articles should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form. They should not occupy more than 12 Journal pages.

Review Articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. Reviews will often be invited, but submitted reviews will also be considered for publication. All reviews will be subject to the same peer review process as applies for original papers. They should not occupy more than 12 Journal pages.

A Short Communication is a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications may be submitted to the journal as such, or may result from a request to condense a regular paper, during the peer review process. They should not occupy more than 5 journal pages (approximately 10 manuscript pages) including figures, tables and references.

Position Papers are informative and thought-provoking articles on key issues, often dealing with matters of public concern. These will usually be invited, but a submitted paper may also be considered for publication. They should not occupy more than 12 Journal pages.

A Technical Note is a report on a new method, technique or procedure falling within the scope of Livestock Science. It may involve a new algorithm, computer program (e.g. for statistical analysis or for simulation), or testing method for example. The Technical Note should be used for information that cannot adequately incorporated into an Original Research Article, but that is of sufficient value to be brought to the attention of the readers of Livestock Science. The note should describe the nature of the new method, technique or procedure and clarify how it differs from those currently in use if cannot be incorporated. They should not occupy more than 5 Journal pages.

Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than two years old.

Contact details for submission

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Before you Begin

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article. Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of Livestock Science.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://elsevier6.custhelp.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923/.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

For Subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other

derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For Open Access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open Access

Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse

- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Elsevier has established agreements with funding bodies, <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. This ensures authors can comply with funding body Open Access requirements, including specific user licenses, such as CC BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. If you need to comply with your funding body policy, you can apply for the CC BY license after your manuscript is accepted for publication.

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for this journal is **\$2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop <http://webshop.elsevier.com/languageediting/> or visit our customer support site <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/livsci/>

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Preparation

Article structure

Manuscripts should have numbered lines, with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered.

However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasise part of the text.

Manuscripts in general should be organised in the following order:

- Title should be clear, descriptive and not too long
- Abstract
- Keywords (indexing terms)
- Introduction
- Material studied, area descriptions, methods, techniques
- Results
- Discussion
- Conclusion
- Acknowledgment and any additional information concerning research grants, and so on
- References
- Figure captions
- Figures (separate file(s))
- Tables (separate file(s))

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author

actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should not be longer than 400 words.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

Authors and Editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.

Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} , not as Ca^{++} .

Isotope numbers should precede the symbols, e.g. ^{18}O .

The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.

- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your

accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the

same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to:

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; NLM Catalog (Journals referenced in the NCBI Databases): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>; CAS (Chemical Abstracts Service): via <http://www.cas.org/content/references/corejournals>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

E-mail address; Full postal address; Phone numbers; All necessary files have been uploaded, and contain: Keywords; All figure captions; All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal

- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)

- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print

- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.