

MONALYZA CADORI GONÇALVES

**CRIOPRESERVAÇÃO DE OÓCITOS E EMBRIÕES BOVINOS:
EFEITO DO LÍQUIDO FOLICULAR E DO BETA
MERCAPTOETANOL**

LAGES – SC

2009

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONALYZA CADORI GONÇALVES

**CRIOPRESERVAÇÃO DE OÓCITOS E EMBRIÕES BOVINOS:
EFEITO DO LÍQUIDO FOLICULAR E DO BETA
MERCAPTOETANOL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência Animal, Área de Concentração Produção Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC), como requisito para obtenção de grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Professor Alceu Mezzalira

LAGES – SC

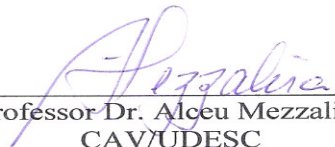
2009

MONALYZA CADORI GONÇALVES

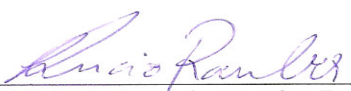
**CRIOPRESERVAÇÃO DE OÓCITOS E EMBRIÕES BOVINOS:
EFEITO DO LÍQUIDO FOLICULAR E DO BETA
MERCAPTOETANOL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência Animal, Área de Concentração em Produção Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC), como requisito para obtenção de grau de Mestre em Ciência Animal.

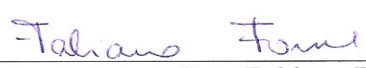
Banca Examinadora:



Professor Dr. Alceu Mezzalira
CAV/UDESC



Professor Dr. Lúcio Pereira Rauber
CAV/UDESC



Dra. Fabiana Forell
CAV/UDESC



Professora Dra. Daniela dos Santos Brum
UNIPAMPA / RS

Lages, SC, 16 março de 2009.

AGRADECIMENTOS

Aos professores Dr. Alceu Mezzalira, Dr. Arnaldo Diniz Vieira e Dr. Marcelo Bertolini, pela orientação, ensino, amizade e compreensão cedidos incondicionalmente.

À Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), pela oportunidade de realização do mestrado, e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e CAPES pelo apoio financeiro para execução do projeto de pesquisa.

Aos frigoríficos Verdi, El' Golli, Pamplona e Fox, pela coleta e entrega de ovários, indispensáveis para a efetivação da parte experimental deste estudo.

Aos integrantes do Laboratório de Reprodução Animal Assis Roberto de Bem, em especial Dra. Fabiana Forell, Dr. Lucio Pereira Rauber e meus bolsistas Murilo Farias e Matheus Pedrotti Cesaro, por toda ajuda nas diversas fases do experimento e dissertação.

A minha mãe, meu pai e minhas irmãs, pelo apoio e conforto durante toda esta trajetória, e que mesmo longe, nunca me deixaram sentir só.

A Deus, pela oportunidade e pelos mestres e amigos que colocou no meu caminho.

Dedico este trabalho ao meu pai e minha mãe que sempre me apoiaram nesta caminhada acadêmica e aos mestres que guiaram-me no aprendizado científico.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária

Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Gonçalves, Monalyza Cadori

Criopreservação de oócitos e embriões bovinos: efeito do líquido folicular e do beta mercaptoetanol / Monalyza Cadori Gonçalves – Lages, 2009.

45 p.

Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências
Agroveterinárias / UDESC.

1. Líquido folicular. 2. β -mercaptoetanol . 3. Criopreservação.
4. Embrião PIV. I. Título.

CDD – 636.08926

RESUMO

O máximo aproveitamento do material genético de alto valor comercial e científico depende do sucesso da criopreservação de oócitos e embriões produzidos *in vitro* (PIV). A vitrificação tem se mostrado mais apropriada para criopreservar essas estruturas, no entanto, ainda é necessário aumentar a viabilidade pós-criopreservação para que a técnica seja adotada na rotina comercial. A reduzida viabilidade, ainda observada, é motivada por características morfológicas e estruturais do oócito e pelo deficiente processo de produção *in vitro* de embriões. Em busca de uma maturação *in vitro* (MIV) mais fisiológica e da redução do estresse oxidativo, no processo de PIV de embriões bovinos, este trabalho avaliou o efeito da exposição de oócitos bovinos, frescos ou vitrificados, por 6 h em líquido folicular (LF) a 30°C, associado ou não da adição de β -mercaptoetanol (BM), no meio de maturação. No Experimento 1, oócitos imaturos foram vitrificados em micropipetas de vidro, com 20% etileno-glicol (EG) + 20% dimetil-sulfóxido + 0,5 M sacarose. Após o reaquecimento em soluções decrescentes de sacarose (0,3M e 0,15M), grupos de 25 oócitos foram aleatoriamente alocados em um de quatro tratamentos, para a maturação: **TCM**, TCM-199 (controle); **BM**, TCM-199+100 μ M BM; **LF**, manutenção em LF + TCM-199, e **LF+B**, manutenção em LF + TCM-199 adicionado de 100 μ M BM. Um grupo não-vitrificado serviu como controle (**CONT**). A viabilidade foi avaliada através da taxa de clivagem (D2), taxa de blastocisto (D7 ao D9) e número de células dos embriões eclodidos. No Experimento 2, grupos de 30 oócitos frescos foram submetidos aos mesmos tratamentos de maturação do experimento 1. Após fecundação (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), os blastocistos expandidos, de qualidade excelente ou boa, obtidos no D7 e D8, foram vitrificados com 20% propileno-glicol + 20% EG. Após o reaquecimento, foram cultivados por 72 horas adicionais, sendo avaliadas as taxas de re-expansão e eclosão. No experimento 1, as taxas de clivagem e blastocisto (D9) do controle não-vitrificado (83,0% e 35,4%), respectivamente foram superiores à de todos os tratamentos vitrificados. Os tratamentos que utilizaram LF apresentaram as menores taxas de clivagem (TCM = 50,5%, BM = 54%, LF = 35,0%, LF+BM = 41,1%). Não houve diferença ($P < 0,05$) nas taxas de blastocistos entre os tratamentos TCM (6,4%), BM (4,0%) e LF (3,4%). No grupo LF+BM não houve desenvolvimento de blastocistos. As

taxas de eclosão e o número de células dos embriões eclodidos não diferiram ($P>0,05$) entre o grupo controle não-vitrificado (43,0%; $158,2\pm 7,3$) e os tratamentos vitrificados TCM (46,1%; $130,9\pm 17,3$), BM (37,4%; $149,3\pm 24,5$) e LF (28,6%; $172,3\pm 30$). No experimento 2, a manutenção em LF determinou as menores taxas de clivagem (LF: 71%, LF+BM: 60,3%). A taxa de blastocisto no D7 do grupo LF+BM (18,1%) foi menor ($P<0,05$) que a dos demais tratamentos (TCM = 28,3%; BM = 22,4%; LF = 24,2%). Não houve diferença na re-expansão entre os tratamentos. Após a vitrificação, a taxa de eclosão nos tratamentos suplementados com BM (BM = 35,4%; LF+BM = 33,9%) foram inferiores às do controle (TCM = 54,16%). A taxa de eclosão do tratamento LF não diferiu de nenhum dos tratamentos. Nos embriões eclodidos, o número de células não diferiu entre os tratamentos. Conclui-se que a exposição por 6 h em LF ou suplementação com BM nos meios de maturação, não melhora o desenvolvimento embrionário e a criotolerância de oócitos imaturos ou embriões PIV, havendo uma interação negativa entre a manutenção em LF e a suplementação de BM nos meios de maturação. Novos estudos são necessários para implementar o sistema de produção *in vitro* de embriões visando obter estruturas mais criotolerantes.

Palavras-chave: líquido folicular, β -mercaptoetanol, criopreservação, oócito, embrião PIV.

LISTA DE TABELAS

	Página
<p>Tabela 1. Taxas de clivagem, blastocisto e eclosão de embriões obtidos de oócitos vitrificados e maturados por 24 h em TCM-199 (TCM); 24 h em TCM-199 + 100 μM BM (BM); expostos por 6 h em líquido folicular + 18 h em TCM-199 (LF), ou expostos por 6 h em líquido folicular + 18 h em TCM-199 + 100 μM BM (LF+BM), bem como de oócitos controle não-vitrificados e maturados em TCM-199 (CONT). Experimento 1.....</p>	26
<p>Tabela 2. Taxas de clivagem e blastocisto obtidas de oócitos maturados por 24 h em TCM-199 (TCM); 24 h em TCM-199 + 100 μM BM (BM); expostos por 6 h em líquido folicular + 18 h em TCM-199 (LF), ou expostos por 6 h em líquido folicular + 18 h em TCM-199 + 100 μM BM (LF+BM). Experimento 2.....</p>	27
<p>Tabela 3. Taxas de re-expansão e eclosão após a vitrificação/reaquecimento de blastocistos expandidos obtidos nos tratamentos TCM (24 h em TCM-199); BM (24 h em TCM-199 +100μM BM); LF (6 h em líquido folicular + 18 h em TCM-199), e LF+BM (6 h em líquido folicular + 18 h em TCM-199 + 100μM BM). Experimento 2.....</p>	28
<p>Tabela 4. Número médio de células e erro padrão de blastocistos eclodidos após vitrificação, em função do grau de qualidade (G1, G2 ou G3) e dos diferentes tratamentos de maturação. Experimento 2.....</p>	29

LISTA DE ABREVIATURAS

ASC	<i>Alanine-serine-cysteine transport system</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BM	β -mercaptoetanol; tratamento com suplementação de β -mercaptoetanol no meio de maturação
BMP-15	<i>Bone morphogenetic protein-15</i>
BSA	Albumina sérica bovina
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
CCO	Complexo <i>cumulus</i> oócito
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CONT	Grupo controle, experimento 1
DMSO	Dimetil-sulfóxido
EG	Etileno-glicol
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fga	<i>Factor in the germline alpha</i>
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante.
GDF-9	<i>Growth differentiation factor-9</i>
GSH	Glutathiona
IBMX	<i>Phosphodiesterase inhibitor isobutyl methyl xanthine</i>
IETS	<i>International Embryo Technology Society</i>
LF	Líquido folicular; tratamento com manutenção em líquido folicular
LF+BM	Tratamento com manutenção em líquido folicular e suplementação de β -mercaptoetanol no meio de maturação
LH	Hormônio luteinizante.
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MIV	Maturação <i>in vitro</i>

MPF	<i>Maturation promoting factor</i>
MV	Micropipetas de vidro
μg	Microgramas
μl	Microlitros
N ₂	Nitrogênio
p34 ^{cdc2}	<i>Cyclin B-cyclin dependent protein kinase-2</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PIV	Produzido/produção <i>in vitro</i>
PROP	Propileno-glicol
SEE	Soro de égua em estro
SOFaaci	<i>Synthetic oviduct fluid with acid amine and sodium citrate</i>
TCM	<i>Tissue culture medium</i>
VG	Vesícula germinativa
Xč	<i>Cystine/glutamate exchange system</i>

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Maturação oocitária <i>in vivo</i>	4
2.1.1 Limitações na maturação citoplasmática e nuclear <i>in vitro</i> de oócitos bovinos.....	5
2.1.2 Bloqueadores da meiose.....	6
2.1.3 Líquido folicular na maturação de oócitos bovinos.....	6
2.2 Estresse oxidativo.....	8
2.2.1 Estresse oxidativo na produção <i>in vitro</i> de embriões.....	10
2.3 Antioxidantes naturais.....	10
2.3.1 Glutathiona (GSH).....	11
2.3.2 Cisteína.....	12
2.3.3 β -mercaptoetanol (BM).....	14
3 CAPÍTULO ÚNICO: Criopreservação de oócitos e embriões bovinos: efeito do líquido folicular e do β -mercaptoetanol	16
3.1 Introdução.....	19
3.2 Materiais e métodos.....	20

3.3	Resultados.....	25
3.4	Discussão.....	29
3.5	Conclusões.....	34
3.6	Referências bibliográficas.....	34
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	39

1. INTRODUÇÃO

Os avanços na manipulação de gametas e na produção *in vitro* de embriões bovinos, bem como de outras espécies, têm levado a um aumento na aplicação de diferentes biotecnologias da reprodução, tanto na pesquisa científica como no setor comercial. O sucesso da aplicação dessas biotecnologias e a otimização da utilização do material genético dependem, contudo, de eficientes métodos de preservação da viabilidade de oócitos e embriões (VAJTA et al., 1996; VAJTA e KUWAYAMA, 2006). A criopreservação permite o armazenamento de gametas por tempo indeterminado, na espera de condições mais adequadas de animais e de instalações, como também a eliminação de obstáculos relacionados à flutuação na quantidade de oócitos, ou à redução da sua qualidade, devido a efeitos sazonais ou problemas sanitários. Permite também, o transporte de germoplasma por longa distância e a criação de bancos genéticos, possibilitando o retorno às origens em caso de seleção equivocada, além de proporcionar a preservação de espécies e linhagens ameaçadas de extinção. No campo da ciência, a criopreservação de oócitos e embriões ainda permite aumentar a disponibilidade de estruturas para utilização em pesquisas, na aplicação e aperfeiçoamento dos processos de produção *in vitro* e das técnicas de manipulação genética, como a transgenia e a transferência nuclear (LE GAL E MASSIP, 1999; HURTT et al., 2000; VIEIRA et al., 2002; MASSIP, 2003; MEZZALIRA et al., 2004; AMBROSINI et al., 2006; CHECURA e SEIDEL, 2007).

Atualmente o método de congelamento convencional de embriões produzidos *in vivo* segue um protocolo que permite a obtenção de taxas de prenhez semelhantes às aquelas obtidas após a transferência de embriões frescos. Entretanto, o mesmo não ocorre com o congelamento de embriões PIV e oócitos bovinos, devido à maior sensibilidade dessas estruturas ao processo de criopreservação, principalmente em função do excessivo tempo de exposição à faixa térmica correspondente à solidificação dos lipídios (ZERON et al., 2002) e da formação de cristais de gelo (RUFFING et al., 1993). A busca por melhores resultados conduziu as pesquisas ao desenvolvimento da vitrificação.

A vitrificação é uma técnica de criopreservação em que a formação de cristais de gelo é prevenida. Para isso, alta velocidade de resfriamento e alta concentração de

crioprotetores são necessárias. Em função de sua maior velocidade de resfriamento e aquecimento, a vitrificação proporciona uma passagem rápida pela faixa de temperatura considerada crítica para oócitos (VAJTA e KUWAYAMA, 2006), diminuindo assim as crioinjúrias.

Para melhorar os resultados da vitrificação, vários estudos avaliaram o aumento da velocidade de resfriamento e novas soluções crioprotetoras (VAJTA e KUWAYAMA, 2006). O aumento da velocidade de resfriamento e reaquecimento foi obtido com diferentes tipos e formatos de materiais para o acondicionamento das estruturas, buscando reduzir o volume e aumentar a eficiência na troca de temperatura durante a imersão em nitrogênio líquido (MEZZALIRA et al., 2002; MEZZALIRA et al., 2004; BUNN et al., 2008). Além disso, foram propostos métodos alternativos para a redução ou eliminação do vapor formado durante a imersão da amostra no nitrogênio líquido (SANTOS et al., 2006; WERLICH et al., 2006). Para diminuir o efeito tóxico e melhorar a permeação dos crioprotetores, foram investigadas diferentes concentrações, tempo de exposição, volume, diluição gradativa e associações entre dois ou mais crioprotetores (FAHY et al., 2004; MEZZALIRA et al., 2004; WERLICH et al., 2006; VIEIRA et al., 2007).

O desenvolvimento de novas metodologias para a vitrificação e a simplificação dos protocolos, aumentou a viabilidade pós-vitrificação de oócitos e embriões PIV. Contudo, os resultados ainda são pouco consistentes e atrativos para a disseminação da técnica. Estes baixos resultados, no entanto, são devidos aos fatores determinados pelas características morfológicas e funcionais das estruturas criopreservadas, bem como pelos processos de produção *in vitro*, que acabam causando um aumento na sensibilidade de oócitos e embriões bovinos PIV (LE GAL e MASSIP, 1999; KIM et al., 2001; VAJTA e KUWAYAMA, 2006).

Como a qualidade do oócito e embrião influencia na sensibilidade e criotolerância, o processo de seleção e produção *in vitro* tem um papel determinante nos resultados pós-vitrificação dessas estruturas. A competência do oócito, bem como o acúmulo de componentes necessários para o início do desenvolvimento embrionário, é adquirida durante o processo de maturação. Uma maturação *in vitro* mais fisiológica permitiria a obtenção de oócitos e embriões PIV de maior qualidade, e como

conseqüência, mais criotolerantes. Por isso, faz-se relevante a abordagem e discussão de fatores que afetem a maturação oocitária *in vitro*, como a falta de sincronia entre a maturação citoplasmática e nuclear, bem como a ocorrência de estresse oxidativo, havendo necessidade da busca de estratégias que possam reduzir estes efeitos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Maturação oocitária *in vivo*

Após o nascimento, os oócitos de mamíferos encontram-se em estágio dictiótene ou vesícula germinativa (VG), parados em diplóteno da prófase I. Com o início da puberdade, a liberação das gonadotrofinas pela hipófise, estimulada pelo hipotálamo, atua no ovário induzindo o desenvolvimento folicular e a maturação oocitária, que consiste da maturação citoplasmática e nuclear (SENGER, 2003).

A maturação citoplasmática envolve inúmeros eventos moleculares, como a síntese e fosforilação de proteínas, ativação de processos metabólicos, como alterações no conteúdo de ATP e redistribuição de mitocôndrias, e mudanças estruturais, como alinhamento dos grânulos corticais e redirecionamento de outras organelas (STOJKOVIC et al., 2001; GONÇALVES et al., 2008; FERREIRA et al., 2009). Esses eventos de maturação citoplasmática ocorrem durante o período de desenvolvimento pré-ovulatório e são cruciais na capacitação do oócito para a fecundação e desenvolvimento inicial do zigoto (BEVERS et al 1997; BLONDIN et al., 1997; HYTTEL et al., 1997; FOULADI NASHTA et al., 1998; WANG et al., 2006; FERREIRA et al., 2009). Embora haja pouco conhecimento dos eventos moleculares que regulam a maturação citoplasmática, sabe-se que o ooplasma armazena RNAm e proteínas para permitir o controle materno durante as primeiras clivagens até que o genoma embrionário seja ativado (8-16 células, no bovino; DURANTHON e RENARD, 2001; WANG et al., 2006; FERREIRA et al., 2009).

A maturação nuclear oocitária refere-se à progressão da meiose a partir da prófase I para a metáfase II (SENGER, 2003). Contudo, embora o oócito de um folículo recrutado pelo efeito das gonadotrofinas inicie sua maturação citoplasmática, seu núcleo permanece em VG até momentos antes da ovulação, no bovino (SENGER, 2003; SUTTON et al., 2003). Entre os fatores reguladores da maturação nuclear, já identificados, estão a cascata da MAPK (*mitogen activated protein kinase*) e o MPF (*maturation promoting factor*) que por sua vez, são controladas por fosfatases e quinases espécies-específicas (SIRARD et al., 1998; ABRIEU et al., 2001; GONÇALVES et al., 2008). A subunidade p34^{cdc2} (*cyclin B-cylin dependent protein kinase-2*) do MPF

encontra-se em níveis muito baixos em oócitos em crescimento, e inativa até o desencadeamento da maturação nuclear. De forma similar, a MAPK é ativada momentos antes do reinício da meiose. Níveis altos de cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*) também contribuem na manutenção do oócito em VG (GONÇALVES et al., 2008).

A interação entre oócito, células da granulosa e células da teca, através da liberação fatores autócrinos e parácrinos, determinam o controle do desenvolvimento folicular e maturação oocitária citoplasmática e nuclear (EPPIG, 2001). As células da granulosa que envolvem o oócito, denominadas células do *cumulus*, atuam também na manutenção do bloqueio oocitário, na indução da reativação da meiose e no suporte à maturação e fecundação (EPPIG, 2001; SUTTON et al., 2003). *In vivo*, após o pico de LH, o aumento da matriz extracelular causa um afastamento entre as células do cumulus, bem como entre as longas extensões citoplasmáticas das células da corona radiata, que penetram a zona pelúcida formando terminações edemaciadas, intimamente associadas com a membrana oocitária. Este afastamento leva à diminuição das junções intercelulares, *gap* e *tight junctions*, entre essas estruturas (VAN SOOM et al., 2002). Esta perda de contato, junto com as alterações bioquímicas, participa do processo que desencadeia a retomada da meiose pelo oócito, preparando-o para a fecundação (SENGER, 2003; SUTTON et al., 2003).

A liberação física do oócito seguida pelo cultivo *in vitro*, também desencadeia a retomada da meiose (PINCUS e ENZMANN, 1935; DURANTHON e RENARD, 2001). No entanto, no sistema de maturação *in vitro* (MIV), os oócitos não conseguem realizar todos os eventos fisiológicos que ocorreriam *in vivo*. Assim, não adquirem a necessária competência, o que resulta, conseqüentemente, em menor qualidade e desenvolvimento embrionário (FOULADI NASHTA et al., 1998; VAN DE LEEMPUT et al., 1999; IWATA et al., 2004).

2.1.1 Limitações na maturação citoplasmática e nuclear *in vitro* de oócitos bovinos

O processo de MIV busca cultivar oócitos em um sistema que proporcione a maturação citoplasmática e nuclear que ocorreria *in vivo*, tornando-os aptos para serem fecundados e se desenvolverem normalmente. No entanto, as condições físicas e os meios empregados na MIV não conseguem proporcionar as mesmas condições fisiológicas que

estas estruturas teriam *in vivo* (NAGAI, 2001; SUTTON et al, 2003). Isso é observado pela menor competência de oócitos maturados *in vitro* em relação aos maturados *in vivo* (VAN DE LEEMPUT et al., 1999; SAGYRKAYA et al., 2007). O sistema de maturação *in vitro* é refletido, inclusive, na qualidade e sobrevivência de oócitos (MEN et al., 2002; GARDNER et al., 2007) e embriões ao processo de criopreservação (DE MATOS et al., 1996; NEDAMBALE et al., 2006) e na viabilidade após transferência (MARTINEZ et al, 1998; VAJTA e KUWAYAMA, 2006).

Estudos conduzidos para entender o metabolismo oocitário e embrionário precoce têm identificado necessidades nutricionais importantes, bem como, melhorado as condições de cultivo *in vitro* (LEESE e BARTON, 1984; RIEGER e LOSKUTOFF, 1994; DOWNS e UTECHT, 1999; LONERGAN et al., 2006; GARDNER et al., 2007; SAGYRKAYA et al., 2007). Contudo, acredita-se que muitos processos bioquímicos para completar a maturação oocitária, principalmente a citoplasmática (MEN et al., 2002), sejam incompletos ou inadequados na MIV (WHITAKER, 2002; GONÇALVES et al., 2008).

Um fator determinante na inadequação da maturação pelo sistema *in vitro*, já conhecido, é a falta de sincronia entre a maturação nuclear e citoplasmática. Ainda que estejam todos em estágio de VG, oócitos obtidos de ovários de abatedouro ou de animais vivos, por punção folicular (OPU), não possuem o mesmo grau de maturação citoplasmática (WU et al., 1997). Com a retirada do oócito do líquido folicular através da punção, ele perde os fatores bloqueadores da maturação nuclear e o processo de meiose é retomado, sem que necessariamente seu citoplasma esteja totalmente capacitado para acompanhar os processos de fecundação e desenvolvimento subsequentes. Uma vez retomada a meiose, a transcrição é inibida, restringindo a posterior programação molecular necessária para a aquisição da competência oocitária (SIRARD, 2001). Como o processo de seleção não permite uma identificação precisa de oócitos competentes, o processo de MIV, embora propicie a maturação nuclear, não consegue contornar a falta de sincronia entre a maturação nuclear e a citoplasmática (NAGAI, 2001).

2.1.2 Bloqueadores da meiose

A manutenção reversível dos oócitos em estágio de VG, *in vitro*, tem sido realizada com diferentes substâncias químicas como a hipoxantina (SIRARD e FIRST, 1988), a roscovitina (MERMILLOD et al., 2000), a butirolactona (PAVLOK et al., 2000), a cicloheximida (LE GAL E MASSIP, 1999), o AMP dibutilil cíclico (*dibutyryl cyclic AMP*, db-cAMP; análogo ao cAMP), o inibidor de fosfodiesterase isobutil-metil-xantina (*phosphodiesterase inhibitor isobutyl methyl xanthine*, IBMX; SIRARD e FIRST, 1988) e o *cordycepin* (SANDRI, 2007). A roscovitina, que bloqueia a ativação da subunidade catalítica do MPF (p34^{cdc2}), tem sido utilizada para manutenção de oócitos em GV, sem comprometer o desenvolvimento embrionário (MERMILLOD et al., 2000; DUQUE et al., 2002; GONÇALVES et al., 2008). Foi sugerido que a hipoxantina, presente no líquido folicular, poderia inibir a hidrólise do cAMP e inibir a reinício da meiose em oócitos bovinos (SIRARD e FIRST, 1988; SUTTON et al., 2003). O ácido linoléico, presente em maiores concentrações no LF de folículos menores, também tem sido utilizado na MIV para inibir a meiose, possivelmente por estimular a atividade da proteína C quinase e, indiretamente, a cAMP, através da *adenylate cyclase* (MURAKAMI et al., 1986; HOMA e BROWN, 1992; SUTTON et al., 2003). No entanto, as melhoras nas taxas de desenvolvimento embrionário não foram atrativas o suficiente para implementar o uso dessas substâncias a fim de melhorar a competência dos oócitos na MIV. O desenvolvimento de uma metodologia mais fisiológica e que permitisse melhorar a maturação citoplasmática aumentaria a competência de desenvolvimento após a fecundação, e conseqüentemente a qualidade e a taxa de oócitos alcançando o estágio de blastocisto.

2.1.3 Líquido folicular na maturação de oócitos bovinos

O líquido folicular é produzido pelas células da granulosa de folículos antrais e filtrado sanguíneo, sendo composto por uma variedade de proteínas, fatores de crescimento, citocinas, esteróides, substratos energéticos e muitas outras substâncias ainda não identificadas, que controlam o desenvolvimento oocitário (SUTTON et al., 2003; WANG et al., 2006). A produção do líquido folicular ocorre em folículos responsivos inicialmente ao FSH liberado pela hipófise. O oócito, induzido pelos componentes do líquido folicular e células do *cumulus*, produz diferentes fatores que

afetam a esteroidogênese, proliferação e diferenciação das células da granulosa, como *growth differentiation factor-9* (GDF-9), *bone morphogenetic protein-15* (BMP-15; EPPIG, 2001; MATZUK et al., 2002; WU e MATZUK, 2002; SUTTON et al., 2003), o *factor in the germline alpha* (Figa; EPPIG, 2001; MATZUK et al., 2002) e o *c-kit* (EPPIG, 2001). A formação de uma cascata de retrocontroles entre hipotálamo, hipófise e ovário, através da produção e liberação de hormônios e diferentes fatores, determina o desenvolvimento do folículo e maturação do oócito (SENGER, 2003). Mesmo o líquido folicular apresentando mudanças em sua composição ao longo do desenvolvimento folicular, é somente após a liberação do pico de LH pela hipófise que as alterações na concentração de hormônios e substâncias do líquido folicular e na inter-relação das células do *cumulus*, desencadeiam a maturação nuclear (SENGER, 2003). Vários estudos buscaram identificar e elucidar como os componentes do líquido folicular promovem a maturação oocitária sem permitir a retomada da meiose (MURAKAMI et al., 1986; IWATA et al., 2004; WANG et al. 2006). Homa e Brown (1992) relataram que uma concentração relativa de ácido linoléico no líquido folicular poderia participar no controle da parada da meiose de oócitos bovinos no estágio de vesícula germinativa. Alguns autores ressaltam a possibilidade de oócitos, quando no ambiente folicular, secretarem fatores que reduzem os efeitos das gonadotrofinas no próprio oócito, eliminando a possibilidade de separação entre células do *cumulus* e oócito, e desta forma, a retomada prematura da meiose, antes do pico de LH (COSKUN et al., 1995; WANG et al., 2006). Como já sugerido (AYOUB E HUNTER, 1993; LEHMKUHL et al., 2002; AVERY et al., 2003), a manutenção dos oócitos em líquido folicular poderia ser usada para retardar a maturação nuclear e possibilitar maior sincronia com a maturação citoplasmática, aumentando assim a competência dos oócitos e a viabilidade dos embriões produzidos.

2.2. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é um processo caracterizado pelo desequilíbrio entre a formação de radicais livres e sua remoção pelo organismo. Este desbalanço pode ocorrer devido ao aumento da geração de radicais livres e/ou pela diminuição dos mecanismos antioxidantes intra e extracelulares (ROVER et al., 2001). Este desequilíbrio causa lesões

nas estruturas celulares e alterações bioquímicas e funcionais, podendo desencadear o processo de apoptose ou até levar diretamente à morte celular por necrose (FEUGANG et al., 2004).

Radical livre é qualquer composto químico que possua um ou mais elétrons desemparelhados que reagem com diferentes moléculas para retirar H⁺, se adicionar a anéis aromáticos, ou transferir elétrons. O elétron livre pode estar junto a um átomo de oxigênio, hidrogênio, nitrogênio, carbono, enxofre ou átomos de metais de transição. Quando estes radicais livres se concentram ao redor de um oxigênio, este caracteriza o que é chamado de espécie reativas de oxigênio (EROs ou ROS, *reactive oxygen species*; ROVER et al., 2001).

A formação de radicais livres, principalmente EROs, ocorre naturalmente no processo de respiração celular, na cadeia de transporte de elétrons, e em diferentes atividades metabólicas. Os principais geradores endógenos de EROs são as mitocôndrias e algumas enzimas como xantina oxidase, citocromo P450-oxidase, monoaminoxidases, NADPH-oxidase, e enzimas envolvidas na produção de prostaglandinas e tromboxanos. A formação de EROs, contudo, não é invariavelmente danosa. Em condições normais, os EROs participam dos mecanismos de reação inflamatória e atuam como segundos mensageiros ou sinalizadores em diferentes funções celulares. Para que as reações e os processos metabólicos dependentes de EROs ocorram adequadamente e a fisiologia celular seja mantida, é necessário um equilíbrio entre a formação e a remoção desses EROs pelos mecanismos antioxidantes (ARAI et al., 1999; ROVER et al., 2001; AGARWAL et al., 2005).

Quando os sistemas antioxidantes naturais são insuficientes para a redução dos EROs formados, estes acabam reagindo com diferentes componente celulares, oxidando-os. Determinados EROs são mais reativos que outros, no entanto, ao reagir com diferentes compostos, EROs de menor agressividade podem se tornar altamente nocivos à célula. Alguns, como o peróxido de hidrogênio, atravessam facilmente as membranas celulares e, ao receberem mais um elétron, tornam-se altamente reativos por precisarem de apenas mais um elétron para se estabilizarem. Com o processo de estabilização, seja recebendo ou doando elétrons de outras moléculas, estes radicais oxidam ácidos graxos poliinsaturados, fosfolipídios e proteínas, lesionando membranas e componentes

celulares, até mesmo o DNA (ROVER et al., 2001). Como as enzimas são componentes protéicos, a mudança da configuração de proteínas pelos EROs acaba também afetando diferentes reações enzimáticas, impedindo o funcionamento normal das atividades celulares. As modificações oxidativas dos componentes celulares através dos EROs são, potencialmente, processos danosos à função celular (AGARWAL et al., 2005), e mesmo que não causem desagregação direta dos componentes celulares, e conseqüentemente necrose, os danos produzidos podem induzir ao desencadeamento da cascada das proteases caspases levando à apoptose (FEUGANG et al., 2004).

2.2.1 Estresse oxidativo na produção *in vitro* de embriões

Os oócitos e embriões, além da estrutura celular relativamente complexa, são muito sensíveis aos radicais livres devido à sua elevada atividade bioquímica e metabólica. No processo de PIV, as estruturas estão mais suscetíveis ao aumento na formação de radicais livres, seja devido às condições não fisiológicas, seja pela manipulação freqüente às quais estão submetidas durante os processos de crescimento, diferenciação e divisão celular (AGARWAL et al., 2006; ESFANDIARI et al., 2007). Além disso, os meios utilizados na PIV não proporcionam um sistema antioxidante ajustado à necessidade dessas estruturas. Estas condições sub-ótimas, com aumento de radicais livres e diminuição de mecanismos de defesa antioxidantes, determinam que oócitos e embriões PIV acabem sofrendo estresse oxidativo, e conseqüentemente, redução na sua qualidade e comprometimento da sua sobrevivência. A apoptose desencadeada pelo estresse oxidativo pode ser deletéria à formação do blastocisto ou levar à morte embrionária na pré-implantação (ESFANDIARI et al., 2007).

2.3. Antioxidantes naturais

As células aeróbicas possuem mecanismos naturais de proteção contra os radicais livres, compostos por sistemas antioxidantes, enzimáticos ou não, que atenuam o efeito do estresse oxidativo através da captura de EROs (DE MATOS e FURNUS, 2000). Os meios de defesa antioxidantes enzimáticos envolvem o ciclo redox da glutathiona, através da glutathiona peroxidase e glutathiona redutase, que convertem peróxido de hidrogênio em

água e oxigênio molecular, da superóxido dismutase (SOD), que converte superóxidos em peróxido de hidrogênio e oxigênio, e da catalase, que converte peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (MEISTER, 1988; ROVER et al., 2001). Em condições normais estas enzimas determinam uma baixa concentração de EROs dentro das células, seja removendo ou impedindo sua formação. A proteção não enzimática é feita por pequenas moléculas, dentre as quais se destacam as vitaminas E (α -tocoferol) e C (ácido L-ascórbico) e a própria glutathiona (GSH; ROVER et al., 2001).

Além dos mecanismos antioxidantes intracelulares, oócitos e embriões estão protegidos dos radicais livres por sequestradores de oxigênios do líquido folicular e fluído do oviduto (GARDINER et al., 1998; KNAPPEN et al., 1999; ALI et al., 2003; CARBONE et al., 2003; AGARWAL et al., 2006). Ainda, no trato reprodutivo e suas secreções são encontradas enzimas reguladoras da síntese de GSH (MCNUTT-SCOTT e HARRIS, 1998; KNAPPEN et al., 1999) que desempenham papel de destaque na proteção contra EROs, diferente do que atualmente ocorre nos meios de maturação e sistemas de cultivo *in vitro* (DE MATOS et al., 1997; ROVER et al., 2001).

2.3.1 Glutathiona (GSH)

A GSH, um tripeptídeo (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina) formado por cisteína, glicina e ácido glutâmico, é o maior componente sulfidril não protéico nas células de mamíferos (MEISTER, 1988). É encontrada em sua forma oxidada (GSSG) ou reduzida (GSH), sendo esta última um importante agente antioxidante que protege as células contra EROs e danos causados por estresse oxidativo. No sistema de defesa enzimático contra radicais livres, a enzima glutathiona peroxidase (GSH-Px e PHGSH-Px) faz a redução de peróxidos de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos (ARAI et al., 1999), enquanto a glutathiona oxidase (GO) faz redução de superóxidos. Na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), a glutathiona redutase (GR) regenera a glutathiona oxidada (GSSG) à sua forma reduzida (GSH) impedindo assim, a paralisação do ciclo metabólico da GSH. O sistema é composto ainda pela glutathiona S-transferase-pi (GSTp) que catala a conjugação da GSH com componentes deletérios para proteger a célula (MEISTER, 1988; KNAPPEN et al., 1999; ROVER et al., 2001).

A GSH é o antioxidante natural presente em maior quantidade em ambos os gametas, atuando direta ou indiretamente em processos biológicos importantes, como a síntese de proteínas e metabolismo e proteção celular (MEISTER, 1988; KNAPPEN et al., 1999; FURNUS et al.; 2008), tendo sido relatada sua síntese durante a maturação oocitária no bovino (DE MATOS et al., 1997). O aumento na concentração de GSH intracelular no ovário foi demonstrado durante o desenvolvimento e maturação oocitária, especialmente próximo da ovulação, quando os oócitos progridem do estágio de vesícula germinativa para o de metáfase II (DE MATOS e FURNUS, 2000; FURNUS et al., 2008). Isto indica que a GSH é armazenada pelo oócito para posterior utilização, sendo que sua concentração ao final da maturação oocitária é considerada um bom marcador bioquímico da viabilidade oocitária (ALI et al., 2003).

Além de proporcionar às células um ambiente redutor, agindo na proteção contra os efeitos tóxicos do stress oxidativo, a GSH participa da descondensação do espermatozóide, paralelo à ativação do oócito, e na transformação do núcleo espermático em pró-núcleo masculino (KNAPPEN et al., 1999; WHITAKER, 2002). É relatado também o efeito benéfico da GSH na proteção contra o estresse térmico de embriões em estádios precoces de desenvolvimento (EDWARDS et al., 2001).

Sendo a GSH um importante componente no processo de maturação citoplasmática, seus níveis afetam os passos subseqüentes da PIV de embriões. De Matos et al. (1997) demonstraram que altas concentrações de GSH induzidas por compostos do tiol durante a MIV, são mantidas até o começo do CIV, melhorando as taxas de desenvolvimento blastocitário. Além disso, estudos demonstraram que a síntese de GSH durante o processo de MIV tem mais efeito no desenvolvimento embrionário subseqüente, do que a síntese durante a fecundação e cultivo *in vitro* (DE MATOS e FURNUS, 2000). Assim, o aumento da síntese de GSH em oócitos durante a maturação é uma maneira de melhorar a qualidade e as chances de desenvolvimento embrionário (WHITAKER, 2002). No entanto, a síntese de GSH, pelo ciclo γ -glutamil, em oócitos bovinos em maturação, é altamente dependente dos níveis de cisteína no meio (DE MATOS et al., 1997; KNAPPEN et al., 1999; FURNUS et al., 2008).

2.3.2 Cisteína

A cisteína, um componente do tiol (substância que possui um grupo funcional composto de enxofre e hidrogênio, grupo sulfidril; -SH), é indispensável e determinante para a síntese de GSH (DE MATOS et al., 1997; KNAPPEN et al., 1999; FURNUS et al., 2008). É um aminoácido instável e prontamente oxidado em cistina quando fora da célula (CHEN et al., 2005). A cisteína é transportada para dentro das células pelo sistema de transporte *alanine-serine-cysteine transport system* (ASC), enquanto a cistina é transportada por outro sistema, o *cystine/glutamate exchange system* (Xc). Em mamíferos, a presença destes transportadores na membrana citoplasmática, varia de acordo com o tipo de célula (DE MATOS et al., 1997).

Enquanto as células do *cumulus* possuem ambos ASC e Xc transportadores, os oócitos só possuem o transportador para cisteína, o ASC, não conseguindo utilizar a cistina do meio. No entanto, a cistina absorvida pelas células do *cumulus* é reduzida a cisteína (DE MATOS et al., 1997) e utilizada para a síntese de GSH, que então é transportada para os oócitos pelas junções *gap* (MORI et al., 2000; SUTTON et al., 2003). Contudo, a síntese de GSH pelas células do *cumulus* a partir de cistina (forma oxidada) é menos eficiente do que quando há cisteína presente (forma reduzida), pois esta permite que a síntese ocorra tanto no oócito, como nas células do *cumulus* (DE MATOS et al., 1997).

Em condições fisiológicas, apenas 3 a 20% da cisteína livre presente no meio extracelular, se encontra na sua forma reduzida. Nos meios utilizados para a maturação e produção de oócitos e embriões, como o TCM 199, a concentração de cisteína é muito baixa, enquanto a de cistina é mais alta. A pouca cisteína do meio, como também aquela presente do soro fetal bovino, tende a ser oxidada totalmente em cistina dentro de aproximadamente 1 hora, independentemente de prévia suplementação (CAAMAÑO et al., 1996; BALASUBRAMANIAN e RHO, 2007).

Contudo, substâncias químicas, como a cisteamina e o β -mercaptoetanol (BM), têm a capacidade de aumentar a disponibilidade da cisteína na forma reduzida no meio extracelular. A suplementação destes componentes no meio de maturação de oócitos tem sido avocada como forma de maximizar a síntese de GSH pelos CCOs e melhorar a qualidade oocitária e as taxas de desenvolvimento embrionário (CAAMAÑO et al., 1996;

DE MATOS et al., 1997; DE MATOS e FURNUS, 2000; BALASUBRAMANIAN e RHO, 2007).

2.3.3 β -mercaptoetanol (BM)

O β -mercaptoetanol é um componente do tiol de baixo peso molecular que, além de possuir efeito antioxidante direto, atua na síntese de GSH (DE MATOS e FURNUS, 2000; WHITAKER, 2002; KITAGAWA et al., 2004; BALASUBRAMANIAN e RHO, 2007). O efeito do BM na síntese de GSH ocorre através de uma troca sulfidril-disulfito com a cistina, reduzindo-a em cisteína e formando um disulfito misto. Através do transportador de leucina (*L-system*), estes disulfitos mistos também podem entrar nas células de mamíferos e serem separados dentro da célula para fornecer uma fonte de cisteína (CAAMAÑO et al., 1996).

Suplementação com componentes do tiol, como o BM e a cisteamina, no meio de maturação ou cultivo, tem melhorado significativamente o desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos e suínos, refletindo em melhores taxas de blastocistos, eclosão e número de células (CAAMAÑO et al., 1996; DE MATOS et al., 1997; DE MATOS e FURNUS, 2000; WHITAKER, 2002; FEUGANG et al., 2004). Com oócitos bovinos, a suplementação com BM durante a MIV tem demonstrado aumentar a síntese de GSH e proporcionar uma reserva disponível até as primeiras clivagens, melhorando a eficiência da produção *in vitro* de embriões a partir de oócitos imaturos (DE MATOS e FURNUS, 2000). O efeito do aumento na síntese de GSH é relacionado também com a diminuição nos níveis de peróxido de hidrogênio no meio e melhores condições intracelulares para o processo de fecundação e cultivo *in vitro* (FEUGANG et al., 2004; KITAGAWA et al., 2004).

Alguns autores relatam ainda que o uso de cisteamina, que é análoga ao BM, no meio de maturação, embora não tenha mostrado efeito positivo na maturação nuclear, melhorou a fertilidade, a competência e a criotolerância após a vitrificação, sugerindo ser devido ao efeito da cisteamina no aumento da síntese de GSH durante o processo de MIV (DE MATOS et al., 1996). Equivalente à cisteamina, o uso do BM nos meios de maturação, ao inibir o efeito nocivo dos radicais livres diretamente e através da otimização da síntese de GSH, poderia levar ao desenvolvimento de estruturas mais

fisiológicas e possivelmente mais criotolerantes. Em vista disso, se faz relevante o estudo do efeito do BM na recuperação da viabilidade oocitária durante a maturação após a vitrificação de oócitos imaturos e na criotolerância de embriões obtidos de oócitos maturados em meio suplementado de BM.

3. CAPÍTULO ÚNICO

Criopreservação de oócitos e embriões bovinos: Efeito do líquido folicular e do β -mercaptoetanol

Artigo a ser submetido ao periódico Ciência Rural (após tradução à Língua Inglesa).

Abstract

Oocytes and *in vitro* produced (IVP) bovine embryos have low cryotolerance due to their characteristics and deficient production system. Follicular fluid (FF) can promote better nuclear and cytoplasmatic maturation, while β -mercaptoethanol (BM) may reduce the oxidative stress, and improve viability and cryotolerance. This study aimed to evaluate the effect of 6 h exposure to FF followed by *in vitro* maturation supplemented or not with 100 μ M BM on the viability of vitrified/thawed immature (VG) oocytes (experiment 1) and cryotolerance of IVP vitrified/thawed blastocysts (experiment 2). In experiment 1, VG oocytes were vitrified with 20% ethylene glycol, 20% dimethyl sulfoxide and 0.5 M sucrose. After warming, groups of 25 oocytes were matured in one of the following treatments: **TCM**, 24h TCM-199 (control); **BM**, 24h TCM-199 +100 μ M BM; **LF**, exposure to FF + 18h TCM-199, and **LF+BM**, exposure to FF + 18h TCM-199 + 100 μ M BM. A non-vitrified group served as control. After *in vitro* fertilization (IVF) and *in vitro* culture (IVC), the cleavage, blastocyst, and hatching rates, as well as the number of cells from hatched embryos were determined. In experiment 2, groups of 30 fresh oocytes were IVM, IVF and IVC as in experiment 1. The expanded blastocysts were vitrified with 20% ethylene glycol and 20% propylene glycol. After warming, they were cultured for additional 72 h to assess the re-expansion and hatching rates. In experiment 1, the FF treatments showed the lower cleavage rates (TCM: 50.5%, BM: 54.0%, LF: 35.0%, LF+BM 41.1%). There was no difference ($P < 0.05$) among the blastocyst rates from TCM (6.4%), BM (4.0%) and LF (3.4%) treatments. None embryo developed from the LF+BM group. The non-vitrified control group had higher cleavage and blastocyst rates (83.0% and 35.4%, respectively) than the vitrified groups. The hatching rates and hatched

embryos cell number in the vitrified treatments (TCM: 46.1%, 130.9±17.3; BM: 37.4%, 149.3±24.5; LF: 28.6%, 172.3±30) did not differ (P>0.05) among them, neither from the non-vitrified group (43.0%, 158.2±7.3). In experiment 2, the FF treatments also showed the lowest cleavage rates (LF: 71% and LF+BM: 60.3%). The blastocyst rate of LF+BM treatment in D7 (18.1%) was lower (P<0.05) than TCM (28.3%), BM (22.4%) and LF (24.2%) treatments rates. The re-expansion did not differ among treatments (P>0.05). The hatching rates (D7 vitrification) in BM treatments (BM: 35.4%; LF+BM: 33.9%), were lower than the control group (TCM: 54.16%). The embryo cells number did not differ among treatments. We conclude that the FF and/or BM treatments neither improve embryonic development nor oocyte and IVP embryo cryotolerance.

Keywords: vitrification, follicular fluid, β -mercaptoethanol, oocyte, embryo.

Resumo

Oócitos e embriões produzidos *in vitro* (PIV) possuem baixa criotolerância devido às suas características morfológicas e estruturais, bem como pelo deficiente processo de produção *in vitro* (PIV) de embriões. O líquido folicular (LF) possibilita adequar a maturação nuclear e citoplasmática e o β -mercaptoetanol (BM) pode reduzir o estresse oxidativo, aumentando a viabilidade e a criotolerância celular. Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da manutenção em líquido folicular (LF) por 6h, bem como da adição de β -mercaptoetanol (BM) ao meio de maturação, no desenvolvimento embrionário de oócitos imaturos vitrificados (Experimento 1) e na sobrevivência embrionária após a vitrificação de embriões PIV (Experimento 2). No experimento 1, oócitos imaturos foram vitrificados com 20% etileno glicol (EG) + 20% dimetil sulfóxido (DMSO) + 0,5M sacarose. Após o reaquecimento, grupos de 25 oócitos foram maturados em um dos seguintes tratamentos: **TCM**, 24h TCM-199 (controle); **BM**, 24h TCM-199 + 100 μ M BM; **LF**, manutenção prévia em LF + 18h TCM-199, e **LF+BM**, manutenção prévia em LF + 18h TCM-199 + 100 μ M BM. Um grupo não-vitrificado serviu como controle. Após a fecundação (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), foram determinadas taxas de

clivagem, blastocisto e eclosão, bem como contadas as células dos embriões eclodidos. No experimento 2, grupos de 30 oócitos frescos foram submetidos a MIV, FIV e CIV como no experimento 1. Os blastocistos expandidos foram vitrificados com 20% propileno-glicol (PROP) + 20% EG. Após o reaquecimento, foram cultivados por 72 horas adicionais, sendo avaliadas as taxas de re-expansão e eclosão. No experimento 1, os tratamentos com LF apresentaram as menores taxas de clivagem (TCM: 50,5%, BM: 54%, LF: 35,0%, LF+BM 41,1%). Não houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre as taxas de blastocistos e entre os tratamentos TCM (6,4%), BM (4,0%) e LF (3,4%). No grupo LF+BM não houve desenvolvimento de blastocistos. As taxas de clivagem e blastocisto do controle não-vitrificado (83,0% e 35,4% , respectivamente) foram maiores que a dos tratamentos vitrificados. As taxas de eclosão e o número de células dos embriões eclodidos não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$) entre os tratamentos vitrificados TCM (46,1%; $130,9 \pm 17,3$), BM (37,4%; $149,3 \pm 24,5$) e LF (28,6%; $172,3 \pm 30$) e nem destes em relação ao grupo controle não-vitrificado (43,0%; $158,2 \pm 7,3$). No experimento 2, os tratamentos com LF também apresentaram as menores taxas de clivagem (LF: 71% e LF+BM: 60,3%). A taxa de blastocisto em D7 do grupo LF+BM (18,1%) foi menor ($P < 0,05$) que a dos demais tratamentos (TCM = 28,3%; BM = 22,4%; LF = 24,2%). Não houve diferença entre as taxas de re-expansão dos tratamentos ($P > 0,05$). As taxas de eclosão dos embriões vitrificados em D7 no tratamento com BM (BM: 35,4%; LF+BM: 33,9%) foram estatisticamente inferiores às do controle (TCM: 54,16%). O número de células dos embriões eclodidos não diferiu entre os tratamentos. Em conclusão, a pré-maturação em LF e/ou a suplementação com BM, na MIV, não melhoram o desenvolvimento embrionário e a criotolerância de oócitos imaturos e embriões PIV.

Palavras-chave: vitrificação, líquido folicular, β -mercaptoetanol, oócito, embrião.

3.1 Introdução

A difusão e otimização de biotecnologias da reprodução, especialmente as que empregam a produção *in vitro* de embriões, dependem de um eficiente método de criopreservação. A inadequação do congelamento convencional para preservar oócitos e embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV), aliada aos resultados promissores obtidos com a vitrificação, determinou que esta metodologia fosse eleita para criopreservar essas estruturas. Todavia, ainda hoje os resultados são pouco consistentes e, portanto, pouco atrativos para a consolidação e difusão da técnica (MARTINO et al., 1996; LE GAL e MASSIP, 1999; LIEBERMANN et al., 2002; MEZZALIRA et al., 2004; VAJTA e KUWAYAMA, 2006).

Além da técnica de criopreservação, existe uma grande influência da qualidade do oócito e embrião em relação à sua sensibilidade e criotolerância (LIEBERMANN et al., 2002; VAJTA e KUWAYAMA, 2006), determinando que o processo de seleção e produção *in vitro* tenha um papel determinante na viabilidade pós-vitrificação dessas estruturas. A competência do oócito e o acúmulo de componentes necessários para o início do desenvolvimento embrionário são adquiridos durante a maturação. A falta de sincronia entre a maturação citoplasmática e nuclear e a ocorrência de estresse oxidativo são fatores que afetam o desenvolvimento e a qualidade embrionária, com reflexos diretos na criotolerância (BLONDIN et al., 1997; IWATA et al., 2004; AGARWAL et al., 2006; ESFANDIARI et al., 2007).

In vivo, o líquido folicular (LF) bloqueia de forma variável a maturação nuclear antes da ovulação. Desta forma, o uso do LF, num período de pré-maturação poderia proporcionar uma adequação e maior sincronia da maturação citoplasmática (HOMA E BROWN, 1992; AYOUB e HUNTER, 1993; LEHMKUHL et al., 2002; AVERY et al., 2003).

Os radicais livres, especialmente as espécies reativas de oxigênio (EROs) originados dos processos oxidativos fisiológicos, produzem alterações estruturais e funcionais nas células. Em condições fisiológicas, os oócitos e embriões são protegidos dos EROs por seqüestradores de oxigênios do líquido folicular e fluído do oviduto. Porém, no cultivo *in vitro*, há um aumento na concentração dos EROs em relação à de antioxidantes devido à concentração atmosférica de oxigênio, manipulação excessiva,

processos de crescimento, diferenciação e divisão celular, e carência de sistemas antioxidantes naturais (DE MATOS et al., 1997; GARDINER et al., 1998; KNAPPEN et al., 1999; ROVER et al., 2001; ALI et al., 2003; AGARWAL et al., 2006).

Um dos sistemas antioxidantes mais abundantes nos gametas é realizado pela enzima glutathiona (GSH). Há um aumento na concentração de GSH intracelular quando oócitos progredem da vesícula germinativa para o estágio de metáfase II, sendo que os níveis de GSH dos oócitos, ao final da maturação, são considerados bons marcadores bioquímicos da sua viabilidade (DE MATOS e FURNUS, 2000). Além disso, a GSH participa da descondensação do espermatozóide, em paralelo à ativação do oócito, e na transformação da cabeça do espermatozóide fertilizante no pró-núcleo masculino (KNAPPEN et al., 1999; WHITAKER, 2002). Contudo, sua síntese depende da cisteína, que no meio extracelular é rapidamente oxidada à cistina. A cistina é absorvida pelas células do *cumulus*, mas não pelos oócitos, diminuindo a eficiência na produção de GSH. Uma das formas de aumentar a absorção da cisteína é através da suplementação de componentes do tiol, como o β -mercaptoetanol (BM), que impedem sua auto-oxidação (DE MATOS et al., 1997; KNAPPEN et al., 1999; FURNUS et al., 2008).

Em vista disso, este estudo teve como objetivo avaliar o emprego do LF e da suplementação com BM no processo de maturação *in vitro*, em relação à qualidade e a criotolerância de oócitos e embriões PIV bovinos, vitrificados.

3.2 Materiais e Métodos

O estudo foi conduzido em dois experimentos, realizados no Laboratório de Reprodução Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias, em Lages, SC.

Todos os procedimentos foram realizados em laboratório com temperatura ambiente controlada entre 25 e 30 °C.

Reagentes químicos

Exceto quando indicado, todos os produtos utilizados nos experimentos foram provenientes do Sigma-Aldrich Química Ltda. (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA).

Obtenção dos oócitos e seleção

Ovários bovinos obtidos em abatedouros foram mantidos a 25 – 35 °C, em solução salina tamponada com fosfato (PBS) adicionada de penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (0,05 mg/mL), durante o transporte ao laboratório. O tempo entre coleta dos ovários e processamento teve duração de 2 a 8 horas. Os complexos *cumuli* oócitos (CCOs) foram aspirados de folículos de 2 a 8 mm de diâmetro para o interior de um tubo cônico (15 mL), através de um scalp 19 G ligado a uma linha de vácuo com pressão de aspiração correspondente a obtenção de um fluxo de 20 mL/minuto. Após dez minutos de espera, o sedimento dos tubos foi passado para uma placa de Petri (90 x 15 mm) para a busca dos CCOs. Depois de recuperados, os CCOs foram selecionados no próprio líquido folicular centrifugado. A busca e seleção foram realizadas sob lupa estéreo-microscópica, sendo utilizados apenas oócitos com citoplasma homogêneo e totalmente envoltos por células do *cumulus oophorus* compactas. No experimento 1, os CCOs selecionados foram vitrificados e, após o reaquecimento, foram distribuídos aleatoriamente entre os 4 tratamentos de maturação. No experimento 2, a distribuição entre os tratamentos foi realizada logo após a seleção.

Delineamento Experimental

Os CCOs selecionados foram aleatoriamente submetidos, em ambos os experimentos 1 e 2, a um dos quatro tratamentos de maturação descritos a seguir:

*Tratamento **TCM**: 24 h em TCM-199 (controle)

*Tratamento **BM**: 24 h em TCM-199 + 100 µM BM

*Tratamento **LF**: 6 h em LF seguidas de 18 h em TCM-199

*Tratamento **LF+BM**: 6 h em LF seguidas de 18 h em TCM-199 + BM

Cada experimento foi realizado com dez repetições, sendo:

- Experimento 1: vitrificação de oócitos imaturos.
- Experimento 2: vitrificação de blastocistos expandidos dos dias 7 (D7) e 8 (D8) de cultivo, apenas os de qualidade excelente ou boa.

Produção dos embriões

Maturação in vitro

Logo após a seleção (Experimento 2) ou vitrificação e reaquecimento (Experimento 1), os CCOs foram divididos aleatoriamente em grupos de 25 (Experimento 1) ou 30 (experimento 2) e submetidos aos diferentes tratamentos.

Os CCOs dos tratamento 1 e 2 foram transferidos para a estufa de cultivo em placas Nunc de quatro poços (NuncTM, Nunc S/A, Roskilde, Denmark; Cat.176740) contendo 400 µL de meio de maturação TCM- 199 - sais de Earle adicionado de 26,2 mM de NaHCO₃, 25 mM de HEPES, 0,2 mM de piruvato de sódio com 0,01 UI de FSH/mL (FolltropinTM - Bioniche, Canada), 0,5 µg/mL de LH (LutropinTM Bioniche, Canada) e 10% de soro de égua em estro (SEE), suplementado (T2) ou não (T1) de BM. Os CCOs correspondentes ao tratamento LF e LF+BM, foram colocados em tubos cônicos de 1,5 mL contendo 1 mL de LF centrifugado (LEHMKUHL et al., 2002), mantidos à temperatura de 30°C em banho maria, por 6 horas, quando então, foram transferidos para estufa de cultivo em placas Nunc de quatro poços, nas mesmas condições do tratamento TCM e BM.

A maturação em estufa de cultivo (Haeraeus Instruments GmbH, Alemanha) foi realizada por 24 h (TCM e BM) ou 18 h (LF e LF+BM) à temperatura de 39 °C, em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade saturada.

Seleção dos espermatozóides

Os espermatozóides, de um único touro *bos-taurus*, foram selecionados pela técnica de migração ascendente (*swim-up*) em meio TALP-Sperm suplementado com 6 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), mantido a 39 °C, em banho-maria. Após 1 hora de migração ascendente, o sobrenadante foi centrifugado por 5 minutos, e o pellet aspirado e diluído para obtenção de uma dose inseminante de 1 a 1,5 x 10⁶ espermatozóides/mL.

Fecundação in vitro

Após a maturação, os CCOs foram depositados em 400µL de meio TALP-Fert, em placas Nunc de quatro poços, adicionado de 30 µg/mL de heparina, 30 µg/mL de penicilinamina, 15 µM de hipotaurina e 1 µM de epinefrina. Os CCOs foram co-cultivados com os espermatozóides por 18-22 horas (D0), em estufa de cultivo a 39°C em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade saturada. Após a fecundação (D1), os prováveis

zigotos foram submetidos à agitação mecânica em meio TCM-HEPES, por 1 minuto, para remoção das células do *cumulus*.

Cultivo in vitro

Imediatamente após o desnudamento, os prováveis zigotos foram cultivados em 400 µL de meio SOFaaci (HOLM et al., 1999) suplementado com 6 mg/mL de BSA, sob óleo mineral, em placas de quatro poços. As placas foram mantidas em bolsa impermeável a gases (*Bag-system*; VAJTA et al., 1997), com uma mistura gasosa contendo 90% de N₂, 5% de O₂ e 5% de CO₂ desde o início do cultivo (Experimento 1) ou após a avaliação da clivagem (D2; Experimento 2) em estufa a 39 °C, 5% CO₂ e máxima umidade relativa.

Experimento 1: Vitrificação de oócitos

Os CCOs foram vitrificados em micropipetas de vidro estiradas com diâmetro interno de aproximadamente 0,35 mm, em grupos de 3 a 5 estruturas. As soluções de vitrificação e reaquecimento foram preparadas a partir de TCM-199, tamponado com HEPES e adicionado de 10% de SEE.

Logo após a punção e seleção, os CCOs a serem vitrificados foram expostos por 30 s a uma solução de equilíbrio com 10% EG + 10% DMSO, seguido de 20 s de exposição na solução de vitrificação com 20% EG + 20% DMSO + 0,5 M sacarose. Após o envase, as micropipetas foram submersas em nitrogênio líquido, sendo mantidas por aproximadamente 30 min até o reaquecimento. O reaquecimento foi realizado através da exposição ao ar por dois a três segundos e imersão em soluções decrescentes de sacarose 0,30 M e 0,15 M, à temperatura de 35 °C. Após cinco minutos em cada solução, foram depositados em TCM-HEPES com 10% de SEE.

Após o reaquecimento, 25 CCOs foram transferidos para cada um dos quatro tratamentos descritos. Os tubos de 1,5 mL com LF contendo os tratamentos LF e LF+BM foram mantidos por seis horas à 30 °C, quando os CCOs passaram para o meio de maturação (TCM-199) com incubação em estufa de cultivo por 18 h. Um grupo controle não vitrificado foi mantido em LF até o final da vitrificação e submetido aos mesmos procedimentos de produção *in vitro* dos tratamentos vitrificados. Com 7, 8 e 9 dias de cultivo, foram avaliadas as taxas de clivagem, blastocistos e eclosão, respectivamente. Os

blastocistos eclodidos, em cada tratamento, separados por grau de qualidade morfológica e dia de eclosão, foram fixados em álcool etílico 99% para avaliação da qualidade através da contagem celular pela coloração de bisbenzimidida.

Experimento 2: Vitrificação de embriões

Após alcançarem o estágio de blastocisto expandido (D7 e D8), os embriões de qualidade boa ou excelente de cada tratamento foram vitrificados. Durante todo o processo, os embriões foram mantidos separados de acordo com seu tratamento inicial.

A vitrificação foi realizada através da exposição por 1 minuto à solução de equilíbrio composta de 10% EG + 10% PROP, seguida de 25 segundos de exposição à solução de vitrificação composta de 20% EG + 20% PROP. Em cada micropipeta de vidro foram envasados, em média, 3 embriões.

O reaquecimento foi realizado pela exposição ao ar por dois a três segundos e imersão em soluções decrescentes de sacarose 0,30 M e 0,15 M, (cinco minutos cada), em temperatura de 35°C. Após o reaquecimento, os embriões foram colocados em cultivo complementar para avaliação de sua capacidade de re-expansão e eclosão *in vitro*, sendo considerados viáveis os que atingiram o estágio de blastocisto eclodido (Be).

Os embriões eclodidos de cada tratamento foram subjetivamente classificados de acordo com sua morfologia em G1, G2 ou G3 e fixados em álcool etílico 99% para determinação da contagem de células pela coloração de bisbenzimidida.

Avaliações

Taxa de clivagem

No experimento 1, a taxa de clivagem foi realizada no D7, junto à avaliação da taxa de blastocistos. No experimento 2, a taxa de clivagem foi determinada após 24 horas de cultivo (D2).

Taxa de blastocistos

Ao final do período de cultivo (D7), foi determinada a taxa de desenvolvimento embrionário nos 4 tratamentos de cada um dos experimentos. Uma segunda avaliação foi realizada no oitavo dia de cultivo. Para o cálculo da taxa de blastocisto, foi considerando

desde o estágio de blastocisto inicial (Bi) no experimento 1, e blastocisto (Bl) no experimento 2, sempre em relação ao número de estruturas inicialmente cultivadas.

No experimento 2, a taxa de re-expansão e eclosão foi avaliada após o reaquecimento dos embriões durante um período de até 5 dias.

Quantidade de células

Os blastocistos eclodidos de cada tratamento foram separados por dia de eclosão e classificação morfológica e corados para quantificar o número de células. Para a contagem celular, após fixação em álcool etílico 99% por no mínimo 12 horas, os embriões permaneceram por 10 minutos em 10 mg/mL de bisbenzimidazol (Hoechst 33342), em HEPES + 10% SEE, abrigados da luz. Em seguida, em uma gota de glicerol (10 µL) montada entre lâmina e lamínula, foram visualizados sob luz UV em microscópio invertido de epifluorescência para a identificação e contagem dos núcleos celulares.

Análise estatística dos dados

As taxas de clivagem e blastocistos foram submetidas à comparação pelo teste χ^2 (pacote estatístico Minitab®, State College, EUA) ou Fisher (planilha Excel, Microsoft®), com nível de significância de 5%.

Os valores da contagem celular foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste Tuckey (pacote estatístico Minitab®, State College, EUA).

3.3 Resultados

Experimento 1: Vitrificação de oócitos

A taxa de clivagem (Tabela 1) do controle não-vitrificado (83,0%) foi superior à de todos os tratamentos vitrificados. Dentre os tratamentos vitrificados, o grupo BM apresentou a melhor taxa de clivagem (54,0%), que não diferiu estatisticamente do grupo TCM (50,5%). A menor taxa foi verificada com o grupo LF (35,0%) que, no entanto, não diferiu do grupo LF+BM (41,1%).

As taxas de blastocisto (Tabela 1) no grupo controle não vitrificado (35,4%) foram estatisticamente superiores aos tratamentos vitrificados. Nos tratamentos

vitricados, as taxas de blastocisto não diferiram entre os grupos TCM (6,4%), BM (4,0%) e LF (3,4%). No grupo LF+BM não houve desenvolvimento de blastocistos.

As taxas de eclosão foram calculadas a partir dos blastocistos obtidos em D9, não sendo observada diferença estatística entre o grupo controle não-vitricado (43,0%) e os tratamentos vitricados TCM (46,1%), BM (37,4%) e LF (28,6%). No entanto, a eclosão nos tratamentos vitricados foi tardia, 83,3 a 100% dos embriões eclodiram a partir do D9, em relação ao grupo controle não-vitricado, no qual apenas 38,2% dos embriões eclodiram a partir do D9.

Tabela 1. Taxas de clivagem, blastocisto e eclosão de embriões obtidos de oócitos vitricados e maturados por 24 h em TCM-199 (**TCM**); 24 h em TCM-199 + 100 μ M BM (**BM**); expostos por 6 h em líquido folicular + 18 h em TCM-199 (**LF**), ou expostos por 6 h em líquido folicular + 18 h em TCM-199 + 100 μ M BM (**LF+BM**), bem como de oócitos controle não-vitricados e maturados em TCM-199 (**CONT**). Experimento 1.

Tratamento	Cultivados	Taxa de clivagem		Taxa de blastocisto				Taxa de eclosão	
		n	%	D7		D9		n	%
TCM	202	102	50,5 ^{bc}	7	3,5 ^b	13	6,4 ^b	6	46,1 ^a
BM	200	108	54,0 ^b	5	2,5 ^b	8	4,0 ^b	3	37,5 ^a
LF	203	71	35,0 ^d	4	2,0 ^b	7	3,4 ^b	2	28,6 ^a
LF+BM	197	81	41,1 ^{cd}	0	0 ^c	0	0 ^c	-	-
CONT	223	185	83,0 ^a	76	34,1 ^a	79	35,4 ^a	34	43 ^a

^{a, b, c, d} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P<0,05).

Na avaliação da qualidade dos blastocistos eclodidos em cada tratamento, não houve diferença estatística entre as médias de células contadas dos blastocistos eclodidos do grupo controle (158,2 \pm 7,3) em relação aos tratamentos vitricados TCM (130,9 \pm 17,3), BM (149,3 \pm 24,5) e LF (172,3 \pm 30). O grupo LF+BM não proporcionou o desenvolvimento de blastocistos, o que impediu sua inclusão na contagem de células. Quando a análise foi procedida levando em consideração a qualidade dos embriões, observou-se número significativamente superior (P<0,05) de células nos blastocistos grau 1 (180,9 \pm 7,4) em relação aos blastocistos grau 2 (125,9 \pm 8,8) apenas no grupo controle

não-vitrificado. Nos demais tratamentos, não houve diferença significativa no número de células entre os embriões de qualidade 1 e 2 ($P>0,05$).

Experimento 2: Vitrificação de embriões

Como observado na tabela 2, o tratamento TCM apresentou a melhor taxa de clivagem (77,5%), que não diferiu ($P>0,05$) do tratamento BM (73,9%). Não houve diferença entre a taxa clivagem do tratamento BM (73,9%) e LF (71,0%). O tratamento LF+BM apresentou 60,3% de clivagem, significativamente inferior aos demais tratamentos ($P<0,05$).

A maior taxa de blastocisto, avaliada em D7, foi observada no tratamento TCM (28,3%) que, todavia, não diferiu do tratamento LF (24,2%). A taxa de blastocistos dos tratamentos LF (24,2%) e BM (22,4%) não apresentaram diferenças estatísticas. Já a menor taxa de blastocistos foi observada no tratamento LF+BM (18,1%) que, no entanto, não diferiu do tratamento BM (22,4%).

Após a vitrificação e reaquecimento, os blastocistos foram mantidos em cultivo para a avaliação das taxas re-expansão e eclosão. Não houve diferença ($P>0,05$) entre as taxas de re-expansão dos blastocistos vitrificados em D7 ou D8 (Tabela 3). Da mesma forma, não foi observado diferenças entre as taxas de re-expansão dos distintos tratamentos.

Tabela 2. Taxas de clivagem e blastocisto obtidas de oócitos maturados por 24 h em TCM-199 (**TCM**); 24 h em TCM-199 + 100 μ M BM (**BM**); expostos por 6 h em líquido folicular + 18 h em TCM-199 (**LF**), ou expostos por 6 h em líquido folicular + 18 h em TCM-199 + 100 μ M BM (**LF+BM**). Experimento 2.

Tratamentos	n	Taxa de clivagem		Taxa de blastocisto D7	
		n	%	n	%
TCM	512	397	77,5 ^a	145	28,3 ^a
BM	514	380	73,9 ^{ab}	115	22,4 ^{bc}
LF	496	352	71,0 ^b	120	24,2 ^{ab}
LF + BM	519	313	60,3 ^c	94	18,1 ^c

^{a, b, c} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P<0,05$).

Em relação à taxa de eclosão, foi observada diferença ($P = 0,057$) entre a taxa obtida com blastocistos vitrificados em D7 (54,2%) em relação ao D8 (37,0%) apenas no tratamento TCM. Nos demais tratamentos, não houve efeito do dia da vitrificação (D7 ou D8) na taxa de eclosão. Com os embriões vitrificados em D7, a maior taxa de eclosão foi observada no tratamento TCM (54,2%) que, todavia, não diferiu do tratamento LF (40,3%). Não foram observadas diferenças entre os grupos BM (35,4%), LF (40,3%) e LF+BM (33,9%). Já nos embriões vitrificados em D8, a taxa de eclosão não diferiu ($P > 0,05$) entre tratamentos (Tabela 3).

A contagem do número de células de embriões eclodidos nos diferentes tratamentos está resumida na tabela 4. Não houve diferença na contagem de células entre os blastocistos eclodidos em D7 ou D8, que assim foram agrupados. Da mesma forma, não foram observadas diferenças na contagem de células dos blastocistos eclodidos com 24, 48 ou 72 horas após o reaquecimento. O número médio de células contadas nos diferentes tratamentos variou entre 112,5 no grupo TCM até 134,8 no grupo LF+BM.

Tabela 3. Taxas de re-expansão e eclosão após a vitrificação/reaquecimento de blastocistos expandidos obtidos nos tratamentos **TCM** (24 h em TCM-199); **BM** (24 h em TCM-199 +100 μ M BM); **LF** (6 h em líquido folicular + 18 h em TCM-199), e **LF+BM** (6 h em líquido folicular + 18 h em TCM-199 + 100 μ M BM). Experimento 2.

Tratamento	Re-expansão %		Eclosão %	
	D7	D8	D7	D8
TCM	72,22 (52/72) ^a	55,55 (15/27) ^a	54,2 (39/72) ^{a/A}	37,0 (10/27) ^{a/B}
BM	69,23 (45/65) ^a	74,19 (23/31) ^a	35,38 (23/65) ^{b/A}	29,03 (9/31) ^{a/A}
LF	67,74 (42/62) ^a	62,06 (18/29) ^a	40,32 (25/62) ^{ab/A}	31,03 (9/29) ^{a/A}
LF + BM	57,62 (34/59) ^a	70,96 (22/31) ^a	33,89 (20/59) ^{b/A}	22,58 (7/31) ^{a/A}

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa. ^{A,B} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Tabela 4. Número médio de células e erro padrão de blastocistos eclodidos após vitrificação, em função do grau de qualidade (G1, G2 ou G3) e dos diferentes tratamentos de maturação. Experimento 2.

Tratamento	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Total
TCM	123,9±15,4 [6]	111,3±16,9 [5]	102,4±15,4 [6]	112,5±9,2 [17]
BM	152,29±14,3 [7]	133,1±14,3 [7]	94,9±15,4 [6]	126,8±8,5 [20]
LF	169,81±13,4 [8]	119,7±15,4 [6]	91,1±19,0 [4]	126,9±9,3 [18]
LF+BM	171,93±14,3 [7]	120,5±18,9 [4]	112,0±26,7 [3]	134,8±12 [13]

P>0,05. TCM (24 h em TCM-199); BM (24 h em TCM-199 +100µM BM); LF (exposição por 6 h em líquido folicular + 18 h em TCM-199) e LF+BM (exposição por 6 h em líquido folicular + 18 h em TCM-199 adicionado de 100 µM BM). [n] = número de estruturas coradas.

3.4 Discussão

Inúmeros trabalhos buscaram adequar a metodologia de criopreservação para oócitos e embriões bovinos PIV, com avanços significativos, como o nascimento de produtos derivados de oócitos vitrificados (VIEIRA et al., 2002) e o aumento na taxa de embriões provenientes de oócitos bovinos vitrificados empregando elevadas taxas de resfriamento e reaquecimento (SANTOS et al., 2006; WERLICH et al., 2006; BUNN et al., 2008). No entanto, os resultados ainda não são adequados para o emprego em rotinas comerciais.

Ao menos em parte, esta baixa viabilidade é determinada pela inadequada produção destas estruturas. A falta de sincronia entre a maturação citoplasmática e nuclear dos oócitos é apontada como uma causa importante da baixa viabilidade dos embriões resultantes (DURANTHON e RENARD, 2001; SUTTON et al., 2003) que, conseqüentemente, são menos criotolerantes. Durante a seleção, é difícil identificar os oócitos com menor competência, pois, *in vitro*, a maturação nuclear ocorre mesmo assíncrona com a maturação citoplasmática (SIRARD et al., 1998; NAGAI, 2001).

Uma forma fisiológica para adequar a maturação citoplasmática e a nuclear poderia melhorar o desenvolvimento e, conseqüentemente, a qualidade dos embriões produzidos (SIRARD, 2001). A manutenção dos oócitos em LF, para retardar a

maturação nuclear (SIRARD e FIRST, 1988; LEHMKUHL et al., 2002), é uma estratégia simples, de fácil execução e que, provavelmente, não altera a fisiologia do oócito. Neste estudo não foi avaliado a dinâmica de maturação dos oócitos e, ao contrário do esperado, a exposição ao LF determinou a redução significativa da taxa de clivagem tanto nos oócitos vitrificados (Experimento 1) como nos oócitos frescos (Experimento 2), em relação aos que não sofreram exposição. Contudo, não foi observada queda na taxa de blastocistos dos dois experimentos.

O tamanho do folículo e o estágio do ciclo estral influenciam a capacidade inibidora do LF na maturação nuclear. Ayoub e Hunter (1993) observaram maior inibição com LF de folículos pequenos e médios (2-9 mm), obtidos durante o estro, com redução do efeito inibidor fora deste período. Já folículos maiores, podem estimular ao invés de inibir a maturação nuclear (SUTTON et al., 2003). Nos dois experimentos, o LF foi obtido de um *pool* dos folículos puncionados, sem qualquer controle da fase estral das fêmeas doadoras, o que pode ter contribuído para o efeito adverso observado. É ainda possível que após a punção, tenha ocorrido a exposição dos oócitos a fatores deletérios provenientes de folículos atrésicos, ou mesmo de maior diâmetro, já que durante a punção não era possível aferir de forma precisa o tamanho folicular. Outra característica relevante, observada em humanos (CARBONE et al., 2003), é a relação inversa entre a faixa etária e a concentração das enzimas envolvidas na desintoxicação de EROs, como a glutathione transferase. Como geralmente não se conhece a idade das vacas utilizadas nos distintos experimentos, é possível que este seja um importante fator responsável pelos resultados controversos em diferentes estudos sobre a composição e o efeito da utilização o LF durante a MIV. Embora conhecidas, estas características não foram consideradas neste estudo, já que se buscou uma forma prática de obter o LF que possibilitasse o emprego imediato na produção *in vitro* de embriões. Isto determinou que os próprios folículos puncionados na obtenção os oócitos fossem a fonte do LF.

É provável ainda que, exista também uma importante atuação das células foliculares na composição e efeito do LF sobre a maturação oocitária. Fouladi Nashta et al. (1998), cultivando folículos antrais intactos, observaram parada meiótica dos oócitos, com aquisição de maior competência *in vitro*. De forma similar, Coleman et al. (2007) observaram que a presença da parede folicular aumentou o desenvolvimento embrionário

precoce, em relação à maturação apenas em LF de folículos dominantes, indicando uma possível interação entre células murais da granulosa e LF no desenvolvimento da competência oocitária. A possibilidade de incorporar fragmentos da parede de folículos ao LF poderia exercer influência na viabilidade embrionária, sendo recomendável que novos ensaios avaliem esta condição.

Uma causa importante da baixa qualidade de oócitos e embriões bovinos PIV é o estresse oxidativo, que se caracteriza pelo desequilíbrio entre a formação de radicais livres e sua remoção pelo organismo. Para que os processos metabólicos dependentes de EROs ocorram adequadamente e a fisiologia celular seja mantida, é necessário um equilíbrio entre a formação e a remoção dos EROs (ROVER et al., 2001). Os meios utilizados na PIV não possuem um sistema antioxidante ajustado à necessidade dessas estruturas (ALI et al., 2003), possibilitando que oócitos e embriões PIV sofram estresse oxidativo com a consequente redução de sua qualidade e comprometimento da sobrevivência (LONERGAN et al., 2006). Pelo seu papel na proteção contra o estresse oxidativo, a GSH constitui um antioxidante natural, sendo relatada sua síntese durante a maturação oocitária no bovino (DE MATOS et al., 1996), indicando que é um dos componentes armazenados pelo oócito para posterior utilização. Os níveis de GSH encontrados nos oócitos, ao final da maturação são, inclusive, considerados como bons marcadores bioquímicos de sua viabilidade (ALI et al., 2003). Assim, o aumento da síntese de GSH nos oócitos em maturação é uma maneira de melhorar sua qualidade e o consequente desenvolvimento embrionário. Contudo, a síntese de GSH é dependente da disponibilidade de cisteína no meio extracelular (DE MATOS et al., 1997; KNAPPEN et al., 1999; FURNUS et al.; 2008), que, em sua maior parte, é encontrada na forma oxidada, a cistina (CAAMAÑO et al., 1996). Como os oócitos não possuem transportadores para cistina, a síntese de GSH é limitada à assimilação deste peptídeo pelas células dos cumulus (DE MATOS et al., 1997). Como forma de contornar esta situação, componentes do tiol, como o BM, têm sido utilizados para manter a cisteína em sua forma reduzida, através de uma troca sulfidril-disulfito, permitindo assim o aumento na síntese de GSH (CAAMAÑO et al., 1996; WHITAKER, 2002). Contudo, os experimentos aqui conduzidos não apontaram diferenças nas taxas de clivagem, blastocisto ou eclosão dos grupos tratados com BM em relação aos grupos controle, tanto

no experimento 1 com oócitos vitrificados, onde houve inclusive uma redução na taxa de blastocistos, quanto no experimento 2, onde os oócitos foram simplesmente cultivados após a exposição em BM na maturação. Estes resultados estão em acordo com os obtidos em estudo concomitante realizado nas mesmas condições laboratoriais (RIBEIRO et al., 2009), onde o uso de BM durante o cultivo *in vitro* não afetou a taxa de clivagem em relação ao controle (80,2% vs. 81,1%), porém afetou negativamente o desenvolvimento até o estágio de blastocisto (28,0% vs. 43,8%). Bai et al. (2008), também não observaram melhora no desenvolvimento de oócitos de fêmeas ovinas pré-púberes, suplementados com BM e cisteína durante a maturação. Todavia, estes resultados são distintos dos observados por outros autores, nos quais a suplementação com compostos do tiol na maturação de oócitos melhorou as taxas de desenvolvimento embrionário (DE MATOS et al., 1997; DE MATOS e FURNUS, 2000). Entretanto, as taxas de clivagem (73,9%) e blastocistos (22,4%) obtidas no grupo tratado com BM neste estudo são semelhantes aos 71,1% e 23,8% obtidas por De Matos e Furnus (2000) nos grupos tratados com BM. Já as taxas de clivagem e blastocistos do grupo controle (61,8% e 15,7%, respectivamente) observada pelos autores foram inferiores ao controle deste trabalho (77,5% e 28,3%, respectivamente). Estes dados podem sugerir que o efeito positivo do BM no meio de maturação ocorre quando as condições de produção são menos adequadas e, assim, proporcionem maior ocorrência de estresse oxidativo. Cabe ainda considerar que, embora nocivos às estruturas celulares, os EROs atuam como mensageiros intracelulares durante o crescimento e diferenciação celular, bem como durante o processo de fecundação (Argawal et al., 2005). É possível que o efeito benéfico do BM na defesa de oócitos e embriões contra os EROs tenha sido mascarado por alterações nas sinalizações fisiológicas das quais esses radicais participam. Isto poderia justificar os resultados observados por Ribeiro et al. (2009), onde o uso de BM durante o cultivo *in vitro* não melhorou a taxa de clivagem e afetou negativamente a taxa de blastocistos (28,0% vs. 43,8%). Entretanto, novos estudos são necessários para comprovar esta hipótese.

É ainda descrito que o uso de cisteamina no meio de maturação, mesmo não mostrando efeito positivo na maturação, pode melhorar a competência e a criotolerância embrionária (DE MATOS et al., 1996; BALASUBRAMANIAN e RHO, 2007). Contudo, nas condições deste estudo, o emprego de BM não melhorou a viabilidade de oócitos

imaturos após a vitrificação (Experimento 1), sendo ainda constatado uma redução na taxa de eclosão dos embriões vitrificados em relação ao grupo sem BM (Experimento 2). Com relação à criotolerância, aparentemente, o BM é mais benéfico se adicionado no cultivo, logo após o processo de criopreservação. Nedambale et al. (2006) demonstraram aumento na sobrevivência, eclosão e no número de células de blastocistos bovinos, com a adição de BM no meio de cultivo após a vitrificação, o que também foi observado por Ribeiro et al. (2009). É possível que o estresse produzido pelo processo de vitrificação, sobre os blastocistos, seja prevenido pela adição subsequente de BM.

O tratamento composto pela associação de LF e BM, produziu resultados inesperados e extremamente nocivos aos oócitos. No experimento 1, esta associação determinou que não houvesse desenvolvimento de blastocistos, após a vitrificação dos oócitos. De forma semelhante, houve significativa redução da viabilidade dos oócitos submetidos ao mesmo tratamento no experimento 2, determinando redução das taxas de clivagem e blastocistos (Tabela 2). Entretanto, os embriões produzidos no tratamento LF + BM, assim como nos tratamentos LF e BM, apresentaram idêntica viabilidade, demonstrada por semelhantes taxas de re-expansão e eclosão (Tabela 3) e número de células (Tabela 4), evidenciando que os embriões, embora em menor quantidade, apresentam similar viabilidade *in vitro*.

Os embriões produzidos a partir de oócitos vitrificados, neste estudo, apresentaram desenvolvimento mais lento, com 83 a 100% das eclosões ocorrendo após o dia 9 de cultivo, diferente do comportamento dos embriões não vitrificados, onde apenas 38,2% das eclosões foram verificadas após D9. Este comportamento deve ser levado em consideração, tanto na avaliação *in vitro*, quanto na avaliação *in vivo*, após transferência. Os parâmetros de viabilidade obtidos nos dois experimentos são semelhantes aos observados em estudos prévios e na rotina de PIV de embriões conduzidos em nosso laboratório. A limitação prática para o uso de LF proveniente de folículos pequenos, sabidamente não atrésicos, e coletados no período do cio, poderá ser contornada pela identificação e adição de substâncias presentes no LF que naturalmente participem do bloqueio meiótico ou promovam a maturação citoplasmática. Estudos da identificação e interação destes componentes, bem como ensaios com componentes já identificados,

como o ácido linoléico, devem ser desenvolvidos na busca de adequar a PIV de embriões bovinos.

3.5. Conclusões

A exposição ao LF por um período de 6 h na pré-maturação, com ou sem a adição de BM no meio de maturação, não melhora as taxas de desenvolvimento nem a qualidade de embriões produzidos a partir de oócitos imaturos vitrificados. De forma semelhante, estes tratamentos não melhoram o desenvolvimento e a criotolerância de embriões PIV, produzidos a partir de oócitos frescos.

A vitrificação de oócitos determina um retardo na eclosão dos embriões, com número significativo de estruturas eclodindo tardiamente, em contraste com oócitos não vitrificados.

Embora promova redução nas taxas de desenvolvimento embrionário, a vitrificação não afeta a qualidade dos blastocistos, avaliada por sua capacidade de eclosão e densidade celular.

Estudos sobre a influência da composição do LF na competência oocitária, bem como alternativas para diminuir crioinjúrias, além da produção de EROs, necessitam ser aprofundados para melhorar a criotolerância de oócitos e embriões PIV bovinos.

3.6 Referências bibliográficas

AGARWAL, A.; SAID, T. M.; BEDAIWY, M. A.; BANERJEE, J.; ALVAREZ, J. G. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. **Fertility and Sterility** 86: 503-512, 2006.

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology** 3: 28, 2005.

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

AVERY B., STROBECH L., JACOBSEN T., BOGH B. I., GREVE T. *In vitro* maturation of bovine cumulus-oocyte complexes in undiluted follicular fluid: effect on nuclear maturation, pronucleous formation and embryo development. **Theriogenology** 59: 987-999, 2003.

AYOUB, M. A.; HUNTER, A. G. Inhibitory effect of bovine follicular fluid on *in vitro* maturation of bovine oocytes. **J. Dairy Sci.** 76: 95-100, 1993.

BAI, J.; HOU, J.; GUAN, H.; YAN, F.; CUI, X.; LIU, L.; WANG, S.; AN, X. Effect of β -mercaptoethanol and cysteine supplementation during *in vitro* maturation on the developmental competence of oocytes from hormone-stimulated lambs. **Theriogenology** 70: 758-764, 2008.

BALASUBRAMANIAN, S.; RHO, G. Effect of cysteamine supplementation of *in vitro* matured bovine oocytes on chilling sensitivity and development of embryos. **Animal Reproduction Science** 98: 282-292, 2007.

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

BUNN, S.; CRUZ, F. B.; PEDRAZZI, C. A. F.; BERTOLINI, M.; VIEIRA, A. D.; MEZZALIRA A. Aumento na sobrevivência após vitrificação de oócitos bovinos imaturos em recipientes com maior condutividade térmica e nitrogênio super-resfriado. **Acta Scientiae Veterinarie** 36: 255-261, 2008.

CAAMAÑO, J. N.; RYOO, Z. Y.; THOMAS, J. A.; YOUNGS, C. R. β -Mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine *in vitro*-matured/*in vitro*-fertilized embryos. **Biology of Reproduction** 55: 1179-1184, 1996.

CARBONE, M. C.; TATONE, C.; DELLE MONACHE, S.; MARCI, R.; CASERTA, D.; COLONNA, R.; AMICARELLI, F. Antioxidant enzymatic defenses in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. **Molecular Human Reproduction** 9: 639-643, 2003.

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

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

DE MATOS, D. G.; FURNUS, C. C.; MOSES, D. F.; MARTINEZ, A. G.; MATKOVIC, M. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. **Mol. Reprod. Dev.** 45: 451-457, 1996.

DE MATOS, D. G.; FURNUS, C. C. The importance of having glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development: effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology** 53:761-771, 2000.

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

EPPIG J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction** 122: 829-838, 2001.

ESFANDIARI, N.; FALCONE, T.; GOLDBERG, J. M.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. K. Heat-shock proteins modulate the incidence of apoptosis and oxidative stress in pre-implantation mouse embryos. **Fertil. Steril.** 87: 1214-1217, 2007.

FOULADI NASHTA, A. A.; WADDINGTON, D.; CAMPBELL, K. H. S. Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development *in vitro*: a comparative evaluation of antral follicle culture with other methods. **Biol. Reprod.** 59, 255–262, 1998.

FURNUS, C. C.; DE MATOS, D. G.; PICCO, S.; GARCÍA, P. P.; INDA, A. M.; MATTIOLI, G.; ERRECALDE A. L. Metabolic requirements associated with GSH synthesis during *in vitro* maturation of cattle oocytes. **Animal Reproduction Science** 109: 88-99, 2008.

GARDINER, C. S.; SALMEN, J. J.; BRANDT, C. J.; STOVER, S. K. Glutathione Is Present in Reproductive Tract Secretions and Improves Development of Mouse Embryos after Chemically Induced Glutathione Depletion. **Biology of Reproduction** 59: 431–436, 1998.

HOLM, P.; BOOTH, P. J.; SCHMIDT, M. H., GREVE, T.; CALLESEN, H. 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, 1999.

HOMA, S. T.; BROWN, C. A. Changes in linoleic acid during follicular development and inhibition of spontaneous breakdown of germinal vesicles in cumulus-free bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility** 94: 153–160, 1992.

IWATA, H.; HASHIMOTO, S.; OHOTA, M.; KIMURA, K.; SHIBANO, K.; MIYAKE, M. Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation médium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes. **Reproduction** 127: 159-164, 2004.

KNAPPEN, M. F. C. M.; ZUSTERZEEL, P. L. M.; PETERS, W. H. M.; STEEGERS, E. A. P. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction: a review. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.** 82: 171-184, 1999.

LE GAL, F.; MASSIP, A. Cryopreservation of cattle oocytes: effects of meiotic stage, cycloheximide treatment, and vitrification procedure. **Cryobiology** 38: 290–300, 1999.

LEHMKUHL, R. C.; MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A. D.; BARBIERI, D. P.; MACHADO, M. F.; RUBIN, M. I. B.; SILVA, C. A. M. Viabilidade de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular. **ARS Veterinária** 18: 273-279, 2002.

LIEBERMANN, J.; NAWROTH, F.; ISACHENKO, V.; ISACHENKO, E.; RAHIMI, G.; TUCKER, M. J. Potential Importance of Vitrification in Reproductive Medicine. **Biology of Reproduction** 67: 1671–1680, 2002.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A.C.O. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology** 65: 137–152, 2006.

MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S. P. 1996. Development into Blastocysts of Bovine Oocytes Cryopreserved by Ultra-Rapid Cooling. **Biology of Reproduction** 54: 1059-1069.

MEZZALIRA, A.; MEZZALIRA, J. C.; MORAES, A. N.; THALER NETO, A.; VIEIRA, A. D.; BARRETA, M. H.; DAMIANI, J. Vitrification of bovine IVP embryos: age of embryos and exposure time to cryoprotectant influence viability. **Archives of Veterinary Science** 9: 107-111, 2004.

NAGAI T. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology** 55: 1291-1301, 2001.

NEDAMBALE, T. L.; DU, F.; YANG, X.; TIAN, X. C. Higher survival rate of vitrified and thawed *in vitro* produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with β -mercaptoethanol. **Animal Reproduction Science** 93: 61-75, 2006.

RIBEIRO, E. S.; GONÇALVES, M. C.; PEDROTTI, M. C.; MARTINS, L. T.; GERGER, R. P. C.; VIEIRA, F. K.; TAVARES, K. C. S.; BERTOLINI, M.; MEZZALIRA, A. Effect of β -mercaptoethanol on the vitrification cryotolerance of bovine IVP embryos. **Reproduction, Fertility & Development** 21: 137-138, 2009. (Abstract)

ROVER JR., L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema Antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim. Nova** 24: 112-119, 2001.

SANTOS, R. M.; BARRETA, M. H.; FRAJBLAT, M.; CUCCO, D. C.; MEZZALIRA, J. C.; BUNN, S.; CRUZ, F. B.; VIEIRA, A. D.; MEZZALIRA, A. Vacuum-cooled liquid nitrogen increases the developmental ability of vitrified-warmed bovine oocytes. **Ciência Rural** 36: 1501-1506, 2006.

SIRARD, M. A.; FIRST, N. L. *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. **Biol. Reprod.** 39: 229-234, 1988.

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

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

SUTTON, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Effects of *in vivo* and *in vitro* environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Hum. Reprod. Update** 9: 35-48, 2003.

VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. The submarine incubation system, a new tool for *in vitro* embryo culture: a technique report. **Theriogenology** 48:1379-1385, 1997.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology** 65: 236-244, 2006.

VIEIRA, A. D.; MEZZALIRA, A.; BARBIERI, D. P.; LEHMKUHL, R. C.; RUBIN, M. I. B.; VAJTA, G. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. **Cryobiology** 45: 91-94, 2002.

WERLICH, D. E.; BARRETA, M. H.; MARTINS, L.T.; VIEIRA, A. D.; MORAES, A. N.; MEZZALIRA, A. Embriões bovinos PIV vitrificados em diferentes soluções crioprotetoras com ou sem o uso de nitrogênio super-resfriado. **Acta Scientiae Veterinariae** 34: 77-82, 2006.

WHITAKER B. D. **Exogenous γ -glutamyl cycle compound supplementation to *in vitro* maturation medium and the effects on subsequent *in vitro* fertilization and culture parameters of porcine oocytes and their impact on embryo viability.** 2002. 98 p. Thesis (Master of Science in Animal Science) - Virginia Polytechnic Institute and State University, June Blacksburg, Virginia, USA, 2002.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ABRIEU, A.; DORÉE, M.; FISHER, D. The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. **J. Cell Sci.** 114: 257-267, 2001.

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology** 3: 28, 2005.

AGARWAL, A.; SAID, T. M.; BEDAIWY, M. A.; BANERJEE, J.; ALVAREZ, J. G. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. **Fertility and Sterility** 86: 503-512, 2006.

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

AMBROSINI, G.; ANDRISANI, A.; PORCU, E.; REBELLATO, E.; REVELLI, A.; CASERTA, D.; COSMI, E.; MARCI, R.; MOSCARINI, M. Oocytes cryopreservation: State of art. **Reproductive Toxicology** 22: 250-262, 2006.

ARAI, M.; IMAI, H.; KOUMOURA, T.; YOSHIDA, M.; EMOTO, K.; UMEDA, M.; CHIBA, N.; NAKAGAWA, Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase plays a major role in preventing oxidative injury to cells. **J. Biol. Chem.** 274: 4924-4933, 1999.

AVERY B., STROBECH L., JACOBSEN T., BOGH B. I., GREVE T. *In vitro* maturation of bovine cumulus-oocyte complexes in undiluted follicular fluid: effect on nuclear maturation, pronucleus formation and embryo development. **Theriogenology** 59: 987-999, 2003.

AYOUB, M. A.; HUNTER, A. G. Inhibitory effect of bovine follicular fluid on *in vitro* maturation of bovine oocytes. **J. Dairy Sci.** 76: 95-100, 1993.

BAI, J.; HOU, J.; GUAN, H.; YAN, F.; CUI, X.; LIU, L.; WANG, S.; AN, X. Effect of β -mercaptoethanol and cysteine supplementation during *in vitro* maturation on the developmental competence of oocytes from hormone-stimulated lambs. **Theriogenology** 70: 758-764, 2008.

BALASUBRAMANIAN, S.; RHO, G. Effect of cysteamine supplementation of *in vitro* matured bovine oocytes on chilling sensitivity and development of embryos. **Animal Reproduction Science** 98: 282-292, 2007.

BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S. J.; VAN DER HURK, R.; IZADYAR, F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology** 47: 13-22, 1997.

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

BUNN, S.; CRUZ, F. B.; PEDRAZZI, C. A. F.; BERTOLINI, M.; VIEIRA, A. D.; MEZZALIRA A. Aumento na sobrevivência após vitrificação de oócitos bovinos imaturos em recipientes com maior condutividade térmica e nitrogênio super-resfriado. **Acta Scientiae Veterinarie** 36: 255-261, 2008.

CAAMAÑO, J. N.; RYOO, Z. Y.; THOMAS, J. A.; YOUNGS, C. R. β -Mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine *in vitro*-matured/*in vitro*-fertilized embryos. **Biology of Reproduction** 55: 1179-1184, 1996.

CARBONE, M. C.; TATONE, C.; DELLE MONACHE, S.; MARCI, R.; CASERTA, D.; COLONNA, R.; AMICARELLI, F. Antioxidant enzymatic defenses in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. **Molecular Human Reproduction** 9: 639-643, 2003.

CHECURA, C. M.; SEIDEL Jr., G. E. Effect of macromolecules in solutions for vitrification of mature bovine oocytes. **Theriogenology** 67: 919-930, 2007.

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

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

COSKUN, S.; UZUMCU, M.; LIN, Y. C.; FRIEDMAN, C. I.; ALAK, B. M. Regulation of cumulus cell steroidogenesis by the porcine oocyte and preliminary characterization of oocyte-produced factor(s). **Biol. Reprod.** 53:670-675, 1995.

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

DE MATOS, D. G.; FURNUS, C. C.; MOSES, D. F.; MARTINEZ, A. G.; MATKOVIC, M. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. **Mol. Reprod. Dev.** 45: 451-457, 1996.

DE MATOS, D. G.; FURNUS, C. C. The importance of having glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development: effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology** 53:761-771, 2000.

DOWNS, S. M.; UTECHT A. M. Metabolism of radiolabeled glucose by mouse oocytes and oocyte-cumulus cell complexes. **Biol. Reprod.** 60: 1446-1452. 1999.

DUQUE, P.; DÍEZ, C.; ROYO, L.; LORENZO, P. L.; CARNEIRO, G.; HIDALGO, C. O.; FACAL, N.; GÓMEZ, E. Enhancement of developmental capacity of meiotically inhibited bovine oocytes by retinoic acid. **Human Reproduction** 17: 2706-2714, 2002.

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

EDWARDS, J. L.; KING W. A.; KAWARSKY, S. J.; EALY, A. D. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP70 and glutathione. **Theriogenology** 55: 209-223, 2001.

EPPIG J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction** 122: 829-838, 2001.

ESFANDIARI, N.; FALCONE, T.; GOLDBERG, J. M.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. K. Heat-shock proteins modulate the incidence of apoptosis and oxidative stress in pre-implantation mouse embryos. **Fertil. Steril.** 87: 1214-1217, 2007.

FAHY G. M., WOWK B., WU J., PAYNTER S. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology* 48: 22–35, 2004.

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** 71: 836-848, 2009.

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

FOULADI NASHTA, A. A.; WADDINGTON, D.; CAMPBELL, K. H. S. Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development *in vitro*: a comparative evaluation of antral follicle culture with other methods. **Biol. Reprod.** 59, 255–262, 1998.

FURNUS, C. C.; DE MATOS, D. G.; PICCO, S.; GARCÍA, P. P.; INDA, A. M.; MATTIOLI, G.; ERRECALDE A. L. Metabolic requirements associated with GSH synthesis during *in vitro* maturation of cattle oocytes. **Animal Reproduction Science** 109: 88-99, 2008.

GARDINER, C. S.; SALMEN, J. J.; BRANDT, C. J.; STOVER, S. K. Glutathione Is Present in Reproductive Tract Secretions and Improves Development of Mouse Embryos after Chemically Induced Glutathione Depletion. **Biology of Reproduction** 59: 431–436, 1998.

GARDNER, D. K.; SHEEHAN, C. B.; RIENZI, L.; KATZ-JAFFE, M.; LARMAN, M. G. Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. **Theriogenology** 67: 64–72, 2007.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2ed. São Paulo, SP: Roca. p. 395, 2008.

HOLM, P.; BOOTH, P. J.; SCHMIDT, M. H., GREVE, T.; CALLESEN, H. 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, 1999.

HOMA, S. T.; BROWN, C. A. Changes in linoleic acid during follicular development and inhibition of spontaneous breakdown of germinal vesicles in cumulus-free bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility** 94: 153–160, 1992.

HURTT, A. E.; LANDIM-ALVARENGA, F.; SEIDEL JR., G. E.; SQUIRES, E. L. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficcol and sucrose solution using open-pulled straws. **Theriogenology** 54: 119-128, 2000.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology** 47: 23–32, 1997.

IWATA, H.; HASHIMOTO, S.; OHOTA, M.; KIMURA, K.; SHIBANO, K.; MIYAKE, M. Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes. **Reproduction** 127: 159-164, 2004.

KIM, J. Y.; KINOSHITA, M.; OHNISHI, M.; FUKUI, Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen–thawed immature and *in vitro* matured bovine oocytes. **Reproduction** 122: 131–138, 2001.

KITAGAWA, Y.; SUZUKI, K.; YONEDA, A.; WATANABE, T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. **Theriogenology** 62: 1186–1197, 2004.

KNAPPEN, M. F. C. M.; ZUSTERZEEL, P. L. M.; PETERS, W. H. M.; STEEGERS, E. A. P. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction: a review. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.** 82: 171-184, 1999.

LE GAL, F.; MASSIP, A. Cryopreservation of cattle oocytes: effects of meiotic stage, cycloheximide treatment, and vitrification procedure. **Cryobiology** 38: 290–300, 1999.

LEESE, H. J.; BARTON, A. M. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. **J. Reprod. Fétil.** 72: 9-13, 1984.

LEHMKUHL, R. C.; MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A. D.; BARBIERI, D. P.; MACHADO, M. F.; RUBIN, M. I. B.; SILVA, C. A. M. Viabilidade de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular. **ARS Veterinária** 18: 273-279, 2002.

LIEBERMANN, J.; NAWROTH, F.; ISACHENKO, V.; ISACHENKO, E.; RAHIMI, G.; TUCKER, M. J. Potential Importance of Vitrification in Reproductive Medicine. **Biology of Reproduction** 67: 1671–1680, 2002.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A.C.O. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology** 65: 137–152, 2006.

MARTINEZ, A. G., DE MATOS, C. G.; FURNUS, C. C.; BROGLIATTI, G.M. *In vitro* evaluation and pregnancy rates after vitrification of *in vitro* produced embryos. **Theriogenology** 50: 757-767, 1998.

MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S. P. 1996. Development into Blastocysts of Bovine Oocytes Cryopreserved by Ultra-Rapid Cooling. **Biology of Reproduction** 54: 1059-1069.

MASSIP A. Cryopreservation of bovine oocytes: Current status and recent developments. **Reprod. Nutr. Dev.** 43: 325–330, 2003.

MATZUK, M. M.; BURNS, K. H.; VIVEIROS, M. M.; EPPIG, J. J. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. **Science** 296: 2178-2180, 2002.

MCNUTT-SCOTT, T. L.; HARRIS, C. Modulation of Intracellular Glutathione and Cysteine Metabolism in Bovine Oviduct Epithelial Cells Cultured In Vitro. **Biology of Reproduction** 59: 314-320, 1998.

MEISTER A. Glutathione metabolism and its selective modification. **The Journal of Biological Chemistry** 263: 17205-17208, 1988.

MEN, H.; MONSON, R. L.; RUTLEDGE, J. J. Effect of meiotic stages and maturation protocols on bovine oocyte's resistance to cryopreservation. **Theriogenology** 57: 1095-1103, 2002.

MERMILLOD, P.; TOMANEK, M.; MARCHAL, R.; MEIJER, L. 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. Dev.** 55: 89-95, 2000.

MEZZALIRA, A.; MEZZALIRA, J. C.; MORAES, A. N.; THALER NETO, A.; VIEIRA, A. D.; BARRETA, M. H.; DAMIANI, J. Vitrification of bovine IVP embryos: age of embryos and exposure time to cryoprotectant influence viability. **Archives of Veterinary Science** 9: 107-111, 2004.

MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A. D.; CRUZ, F. B. Vitricificação de ovócitos bovinos com a utilização de micropipetas de vidro ou palhetas estiradas. **Revista de Ciências Agroveterinárias** 2: 108-114, 2002.

MORI, T.; AMANO, T.; SHIMIZU H. Roles of Gap Junctional Communication of *cumulus* cells in cytoplasmic maturation of porcine oocytes cultured *in vitro*. **Biology of Reproduction** 62: 913-919, 2000.

MURAKAMI, K.; CHAN, S.Y.; ROUNTENBERG, A. Protein kinase C activation by cis-fatty acid in the absence of Ca²⁺ and phospholipids. **Journal of Biological Chemistry** 261: 15424-15429. 1986.

NAGAI T. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology** 55: 1291-1301, 2001.

NEDAMBALE, T. L.; DU, F.; YANG, X.; TIAN, X. C. Higher survival rate of vitrified and thawed *in vitro* produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with β -mercaptoethanol. **Animal Reproduction Science** 93: 61-75, 2006.

PAVLOK, A.; KANKA, J.; MOTLIK, J.; VODICKA P. Culture of bovine oocytes from small antral follicles in meiosis-inhibiting medium with butyrolactone I: RNA synthesis, nucleolar morphology and meiotic competence. **Anim. Reprod. Sci.** 64: 1-11, 2000.

PINCUS, G.; ENZMANN, E. V. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Experimental Medicine** 62: 665-675, 1935.

RIBEIRO, E. S.; GONÇALVES, M. C.; PEDROTTI, M. C.; MARTINS, L. T.; GERGER, R. P. C.; VIEIRA, F. K.; TAVARES, K. C. S.; BERTOLINI, M.; MEZZALIRA, A. Effect of β -mercaptoethanol on the vitrification cryotolerance of bovine IVP embryos. **Reproduction, Fertility & Development** 21: 137-138, 2009. (Abstract)

RIEGER, D.; LOSKUTOFF, N. M. Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.** 100: 257-262, 1994.

ROVER JR., L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema Antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quím. Nova** 24: 112-119, 2001.

RUFFING, N. A.; STEPONKUS, P. L.; PITT, R. E.; PARKS, J. E. Osmometric behavior, hydraulic conductivity, and incidence of intracellular ice formation in bovine oocytes at different developmental stages. **Cryobiology** 30: 562-580, 1993.

SAGIRKAYA, H.; MISIRLIOGLU, M.; KAYA, A.; FIRST, N. L.; PARRISH, J. J.; MEMILI, E. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. **Animal Reproduction Science** 101: 225-240, 2007.

SANDRI L. R. **Bloqueio meiótico *in vitro* com cordycepin e roscovitine na maturação e rearranjo ultraestrutural do citoplasma de oócitos bovinos.** 2007. 58p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, 2007.

SANTOS, R. M.; BARRETA, M. H.; FRAJBLAT, M.; CUCCO, D. C.; MEZZALIRA, J. C.; BUNN, S.; CRUZ, F. B.; VIEIRA, A. D.; MEZZALIRA, A. Vacuum-cooled liquid nitrogen increases the developmental ability of vitrified-warmed bovine oocytes. **Ciência Rural** 36: 1501-1506, 2006.

SENGER, P. L. **Pathways to Pregnancy and Parturition.** 2 ed. Pullman, WA: Current conceptions, 2003. 373 p.

SIRARD, M. A.; FIRST, N. L. *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. **Biol. Reprod.** 39: 229-234, 1988.

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

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

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

SUTTON, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Effects of *in vivo* and *in vitro* environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Hum. Reprod. Update** 9: 35-48, 2003.

VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Overall efficiency of *in vitro* embryo production and vitrification. **Theriogenology** 45: 683-689; 1996.

VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. The submarine incubation system, a new tool for *in vitro* embryo culture: a technique report. **Theriogenology** 48:1379-1385, 1997.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology** 65: 236–244, 2006.

VAN DE LEEMPUT, E. E.; VOS, P. L. A. M.; ZEINSTRAS, E. C.; BEVERS, M. M.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; DIELEMAN, S. J. Improved *in vitro* embryo development using *in vivo* matured oocytes from heifers superovulated with a controlled preovulatory LH surge. **Theriogenology** 52: 335–349, 1999.

VAN SOOM, A.; TANGHE, S.; DE PAUW, I.; MAES, D.; DE KRUIF, A. Function of the *cumulus oophorus* before and during mammalian fertilization. **Reprod. Dom. Anim.** 37: 144–151, 2002.

VIEIRA, A. D.; FORELL, F.; FELTRIN, C.; RODRIGUES, J. L. In-straw cryoprotectant dilution of IVP bovine blastocysts vitrified in hand-pulled glass micropipettes. **Animal Reproduction Science** 99: 377–383, 2007.

VIEIRA, A. D.; MEZZALIRA, A.; BARBIERI, D. P.; LEHMKUHL, R. C.; RUBIN, M. I. B.; VAJTA, G. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. **Cryobiology** 45: 91–94, 2002.

WANG, T. H.; CHANG, C. L.; WU, H. M.; CHIU, Y. M.; CHEN, C. K.; WANG, H. S. Insulin-like growth factor-II (IGF-II), IGF-binding protein-3 (IGFBP-3), and IGFBP-4 in follicular fluid are associated with oocyte maturation and embryo development. **Fertility and Sterility** 86: 1391–1401, 2006.

WERLICH, D. E.; BARRETA, M. H.; MARTINS, L.T.; VIEIRA, A. D.; MORAES, A. N.; MEZZALIRA, A. Embriões bovinos PIV vitrificados em diferentes soluções crioprotetoras com ou sem o uso de nitrogênio super-resfriado. **Acta Scientiae Veterinariae** 34: 77-82, 2006.

WHITAKER B. D. **Exogenous γ -glutamyl cycle compound supplementation to *in vitro* maturation medium and the effects on subsequent *in vitro* fertilization and culture parameters of porcine oocytes and their impact on embryo viability.** 2002. 98 p. Thesis (Master of Science in Animal Science) - Virginia Polytechnic Institute and State University, June Blacksburg, Virginia, USA, 2002.

WU, B.; IGNOTZ, G.; CURRIE, W. B.; YANG, X. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Biol. Reprod.** 56, 253–259, 1997.

WU, X.; MATZUK, M. M. GDF-9 and BMP-15: oocyte organizers. **Rev. Endo. Met. Dis.** 3: 27–32, 2002.

ZERON, Y.; TOMCZAK, M.; CROWE, J.; ARAV, A. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. **Cryobiology** 45: 143–152, 2002.