

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**TENSÃO DE OXIGÊNIO DURANTE O CULTIVO IN VITRO DE EMBRIÕES  
BOVINOS: EFEITO NA PRODUÇÃO E EXPRESSÃO DE GENES  
RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO**

**GEORGIA ASSIS CORRÊA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE DE AGRONOMIA  
E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE  
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
CIÊNCIAS AGRÁRIAS NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DE PRODUÇÃO  
ANIMAL.**

---

**MARGOT A. N. DODE, PhD (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)  
(CO-ORIENTADORA) CPF: 395.928.980-45  
E-mail: margot@cenargen.embrapa.br**

**APROVADA POR:**

---

**RODOLFO RUMPF, PhD (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)  
(ORIENTADOR) CPF: 295.718.049-91  
E-mail: rodolfo@cenargen.embrapa.br**

---

**CAROLINA MADEIRA LUCCI, PhD (FAV / UnB)  
(EXAMINADOR INTERNO) CPF: 490.390.241-20  
E-mail: cmlucci@unb.br**

---

**MAURÍCIO M. FRANCO, PhD (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)  
(EXAMINADOR EXTERNO) CPF: 517.692.476-53  
E-mail: mfranco@cenargen.embrapa.br**

**BRASÍLIA/DF, 30 de JUNHO de 2006**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Corrêa, Georgia Assis

Tensão de oxigênio durante o cultivo in vitro de embriões bovinos: efeito na produção e expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo. / Georgia Assis Corrêa; orientação de Rodolfo Rumpf. – Brasília, 2006.

61 p. : il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2006.

1. Bovino. 2. Embriões. 3. Tensão de oxigênio. 4. Estresse oxidativo. I. Rumpf, R. II. PhD.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

CORRÊA, G. A. **Tensão de oxigênio durante o cultivo in vitro de embriões bovinos: efeito na produção e expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2006, 61 p. Dissertação de Mestrado.

## CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Georgia Assis Corrêa

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Tensão de oxigênio durante o cultivo in vitro de embriões bovinos: efeito na produção e expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo.

GRAU: Mestre

ANO: 2006

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

---

Georgia Assis Corrêa

CPF 695.852.101-34

Brasília / DF - Brasil

Telefone: (61) 9644-9794 / 3448-4693

E-mail: georgia@cenargen.embrapa.br

**Dedico este trabalho à minha família...**

**Meus pais,**

**Malaquias e Elisabeth,**

**Que sempre me apoiaram e incentivaram com muito amor.**

**Aos meus irmãos,**

**Malaquias Júnior e Guilherme,**

**Por acreditarem sempre.**

**Obrigado por tudo,**

**Vocês são incríveis!!!**

**Com amor....**

**Ao meu marido Getulio...**  
**Obrigado meu amor,**  
**Por ter estado ao meu lado sempre,**  
**Me apoiando e acreditando.**  
**Te amo!!!...**

## AGRADECIMENTOS

À Deus pelas bênçãos, e por nos permitir alcançar as vitórias.

À meus pais, meus irmãos e meu marido pelo amor e carinho sempre.

Às minhas queridas tias Maria Aparecida e Georgina, e minha madrinha Alice pelo apoio e amor.

Ao Dr. Rodolfo Rumpf, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação e os ensinamentos.

À Dra. Margot, por sua dedicação e amizade, estando sempre presente ensinando e orientando com paciência e sabedoria.

Às minhas companheiras de trabalho e grandes amigas Ligiane e Grazieli. Vocês são maravilhosas!!!

Aos amigos que fiz durante o mestrado, Rosângela, Walliston, Rabinho, Fred, Marcelo, Renata, Katlen, Lílian, Dany Pereira, Dani Brandão, Natalie, Léo Gaúcho, Thiago Antônio, Regivaldo e todos os amigos da Fazenda Sucupira, pelo apoio no dia a dia.

Aos amigos Maurício e Tatiane Mundim, pela amizade, ajuda e grande ensinamento.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo suporte para a realização deste trabalho.

À UnB, pela oportunidade e acolhida nesta realização profissional.

À CAPES pelo apoio financeiro.

## ÍNDICE

RESUMO-----	xiii
ABSTRACT-----	xv
INTRODUÇÃO-----	01
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-----	04
PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES-----	04
Maturação in vitro-----	04
Fecundação in vitro-----	07
Cultivo in vitro-----	09
EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES-----	11
EFEITO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO EMBRIÃO PIV-----	16
OBJETIVO GERAL-----	20
HIPÓTESE-----	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	22
CAPÍTULO ÚNICO	
TENSÃO DE OXIGÊNIO DURANTE O CULTIVO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS: EFEITO NA PRODUÇÃO E EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO-----	28
RESUMO-----	29
ABSTRACT-----	31
INTRODUÇÃO-----	33
MATERIAL E MÉTODOS-----	36
Coleta e seleção de ovócitos-----	36
Maturação in vitro de ovócitos-----	36
Fecundação in vitro-----	37
Cultivo in vitro de embriões-----	38
Avaliação do número total de células dos embriões-----	39
Avaliação da expressão gênica-----	39
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL-----	42
ANÁLISE ESTATÍSTICA-----	44

RESULTADOS-----	45
DISCUSSÃO-----	51
CONCLUSÃO-----	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	58

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

<b>AI</b>	<b>Anáfase I</b>
<b>BSA</b>	<b>Albumina Sérica Bovina</b>
<b>BRL</b>	<b>Células de fígado de rato búfalo</b>
<b>Bx</b>	<b>Blastocisto expandido</b>
<b>CCOs</b>	<b>Complexos cumulus-ovócito</b>
<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>Dióxido de carbono</b>
<b>CSH</b>	<b>Cistina</b>
<b>DNA</b>	<b>Ácido desoxirribonucléico</b>
<b>FIV</b>	<b>Fecundação in vitro</b>
<b>FSH</b>	<b>Hormônio folículo estimulante</b>
<b>hpi</b>	<b>Horas pós inseminação</b>
<b>GPX</b>	<b>Glutationa peroxidase</b>
<b>GSH</b>	<b>Glutationa</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Peróxido de hidrogênio</b>
<b>IA</b>	<b>Inseminação artificial</b>
<b>ICSI</b>	<b>Injeção intracitoplasmática de espermatozóide</b>
<b>IVP</b>	<b>Produção in vitro</b>
<b>LH</b>	<b>Hormônio luteinizante</b>
<b>MI</b>	<b>Matáfase I</b>
<b>MII</b>	<b>Matáfase II</b>
<b>MIV</b>	<b>Maturação in vitro</b>
<b>MPF</b>	<b>Fator promotor de maturação</b>
<b>mRNA</b>	<b>RNA mensageiro</b>
<b>O<sub>2</sub></b>	<b>Oxigênio</b>
<b>PCR</b>	<b>Reação em cadeia da polimerase</b>
<b>PHE</b>	<b>Penicilamina, hipotaurina, epinefrina</b>
<b>PI</b>	<b>Prófase I</b>
<b>PIV</b>	<b>Produção in vitro</b>
<b>PVA</b>	<b>Álcool polivinílico</b>
<b>PVP</b>	<b>Polivinilpirrolidone</b>
<b>RNA</b>	<b>Ácido ribonucléico</b>
<b>RT-PCR</b>	<b>Transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase</b>
<b>ROS</b>	<b>Espécies reativas de oxigênio</b>
<b>SFB</b>	<b>Soro fetal bovino</b>
<b>SOD</b>	<b>Superóxido dismutase</b>
<b>SOF</b>	<b>Fluido sintético de oviduto</b>
<b>SOFaaci</b>	<b>Fluido sintético de oviduto com aminoácidos, citrato, myo-inositol</b>
<b>SOX</b>	<b>Sarcosine oxidase</b>
<b>TI</b>	<b>Telófase I</b>



**VERO Células de rim de macaco verde**

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sequência dos <i>primers</i> utilizados no experimento.-----	40
<b>Tabela 2.</b> Produção in vitro de embriões bovinos cultivados sob alta (T1) e baixa (T2) tensão de O <sub>2</sub> .-----	45
<b>Tabela 3.</b> Avaliação do número total de células dos embriões produzidos sob diferentes tensões de oxigênio, 20% (T1) e 5% (T2).-----	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Embriões D7 produzidos em sistema com baixa tensão de O<sub>2</sub>.-----46
- Figura 2:** Embriões D7 produzidos em sistema com alta tensão de O<sub>2</sub>.-----46
- Figura 3:** Blastocisto expandido em D7 corado com orceína-acética para contagem do número total de células.-----48
- Figura 4:** Quantidade relativa de mRNA dos genes Manganês Superóxido Dismutase (Mn-SOD), Catalase e Glutathione Peroxidase (GPX4) em embriões no estágio de Bx em D7, cultivados em sistemas com alta (20%) e baixa (5%) tensão de O<sub>2</sub>.-----49
- Figura 5:** Eletroforese em gel de agarose, representando os amplicons para os genes GAPDH, GPX, catalase e Mn-SOD.-----50
- Figura 6:** Eletroforese em gel de agarose representando os amplicons para os genes Interferon- $\tau$  e GAPDH-----50

**TENSÃO DE OXIGÊNIO DURANTE O CULTIVO IN VITRO DE EMBRIÕES  
BOVINOS: EFEITO NA PRODUÇÃO E EXPRESSÃO DE GENES  
RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO**

**RESUMO**

Apesar dos avanços obtidos nos últimos anos nas técnicas de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* de embriões bovinos, a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* ainda é inferior a dos *in vivo*. O ambiente de cultivo após a fecundação é considerado responsável pela qualidade dos embriões. Dentre os fatores que podem influenciar o ambiente de cultivo, o estresse oxidativo causado pela alta tensão de O<sub>2</sub> tem recebido especial atenção. Atualmente, a maioria dos sistemas de cultivo utilizada para a PIV usa o meio SOFaaci com atmosfera de 5% de O<sub>2</sub>. Portanto, o presente estudo teve por objetivo comparar a produção de embriões em sistema de cultivo com alta e baixa tensão de O<sub>2</sub>. Um total de 1118 ovócitos obtidos de ovários de abatedouro foram maturados e fecundados *in vitro*. Vinte horas após a inseminação (pi) os zigotos foram separados em 2 grupos. No primeiro grupo (T1) os zigotos foram lavados e transferidos para o meio de cultivo SOFaaci e cultivados por 7 dias em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> em ar, à 39°C. No outro grupo (T2), os zigotos foram desnudados por pipetagens sucessivas, e transferidos para o meio SOFaaci, onde foram cultivados em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub>, a 39°C. As taxas de clivagem foram avaliadas 48 horas pi e as de blastocisto em D6 e D7 pi. De ambos os grupos, um total de 94 embriões no estágio de blastocisto expandido em D7 foram fixados e corados com aceto-orceína para contagem do número de células, e 7 “pools” com 15 embriões de cada tratamento, foram congelados para avaliação da expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo, sendo superóxido dismutase (Mn-SOD), catalase e glutathione peroxidase (GPX4). Os dados relativos à taxa de clivagem e blastocisto foram analisados pelo teste do Chi-quadrado, os de número de células pela análise de variância e os

relativos à expressão gênica, pelo teste *t* de *Student* ou teste de Mann-Whitney. A taxa de clivagem foi semelhante ( $P>0,05$ ) para os grupos sendo 77,4% para o T1 e 79,9% para o T2. A taxa de blastocisto em D6 foi maior ( $P<0,05$ ) no grupo cultivado em baixa tensão de  $O_2$  (40,7%) do que no de alta tensão (33,8%). Entretanto, a taxa de blastocisto em D7 foi similar ( $P>0,05$ ) para os dois grupos, sendo 44,7% e 47,1% para T1 e T2, respectivamente. O número total de células (T1=  $175,6\pm 54,1$ ; T2=  $160,6\pm 41,8$ ) dos embriões, não variou ( $P>0,05$ ) entre os dois sistemas de cultivo. A quantidade relativa de transcritos para o gene Mn-SOD foi maior ( $P<0,05$ ) na presença de alto  $O_2$ , para a catalase e a GPX4 o nível de expressão foi semelhante nos dois sistemas de cultivo. Esses resultados sugerem que o cultivo de embriões bovinos em meio SOFaaci sob alta tensão de  $O_2$  na presença de células do *cumulus* não afeta a quantidade e qualidade dos embriões produzidos *in vitro*. É possível que as células do *cumulus* tenham um papel importante na retirada de substâncias indesejáveis minimizando o estresse oxidativo causado pela alta tensão de  $O_2$ .

Palavras-chave: Bovino, Embriões, Tensão de oxigênio e Estresse oxidativo.

# OXIGEN TENSION DURING IN VITRO CULTURE OF BOVINE EMBRYOS: EFFECT IN PRODUCTION AND GENE EXPRESSION RELATED WITH OXIDATIVE STRESS

## ABSTRACT

Although substantial progress has been made in the procedures for *in vitro* maturation, fertilization and culture of bovine oocytes, the percentage and quality of embryos produced *in vitro* are lower than those produced *in vivo*. The environment where embryos are cultured after fertilization is the main factor responsible for their quality. Among the factors that can influence the culture environment, oxidative stress caused by high O<sub>2</sub> tension, has received special attention. Currently, the majority of the *in vitro* culture systems for embryo production (IVP) use SOFaaci medium under 5% of O<sub>2</sub>. Therefore, the present study had the objective to compare *in vitro* embryo production using high and low O<sub>2</sub> during embryo culture. A total of 1118 oocytes obtained from abattoir ovaries were matured and fertilized *in vitro*. Twenty hours pos-insemination (hpi) the zygotes were divided into two groups. In the first group (T1) the zygotes were washed and transferred to SOFaaci medium and cultured for 7 days under 5% CO<sub>2</sub> in air, at 39°C. In the second group (T2) the zygotes were denuded by successive pipetting and then, transferred to SOFaaci medium and cultured under 5% CO<sub>2</sub> and 5% de O<sub>2</sub> at 39°C. Cleavage rates were evaluated 48 hpi and the blastocyst rates at D6 and D7 pi. From both groups a total of 94 expanded blastocyst, from D7 of culture, were fixed and stained with aceto-orcein to evaluate cell numbers. Seven pools of 15 embryos from each treatment were frozen for gene expression evaluation. The abundance of transcripts for genes related to oxidative stress, superoxide dismutase (Mn-SOD), catalase and glutathione peroxidase (GPX) were determined using a semi-quantitative PCR. Data for cleavage and blastocyst rates were analyzed by Chi-square test and those for embryo cell number by analysis of variance. Data from gene expression were analyzed by *t* test or Mann-Whitney test. Cleavage rate was similar ( $P>0.05$ ) for both groups, being 77.4 % for T1 and 79.9% for T2. The blastocyst rate at D6 pi was

higher ( $P < 0.05$ ) in the group cultured under low  $O_2$  tension (40.7%) than in the high  $O_2$  tension (33.8%). However, blastocyst rate at D7 was similar ( $P > 0.05$ ) for both groups, being 44.7% and 47.1% for T1 and T2, respectively. Embryos total cell numbers (T1=175.6±54.1; T2=160.6±41.8) did not differ between culture systems ( $P > 0.05$ ). The relative abundance of transcripts for Mn-SOD gene was higher ( $P < 0.05$ ) for embryos cultured in high  $O_2$  tension. The catalase and GPX expression level was similar for both systems. The results suggested that culture of bovine embryos in SOFaaci medium under high  $O_2$  tension, in the presence of *cumulus* cells, does not affect quantity and quality of IVP embryos. It is possible that the *cumulus* cells have an important role in the removal of detrimental substances, minimizing the oxidative stress caused by the high  $O_2$  concentration.

Key words: Bovine, Embryos, Oxygen tension, Oxidative stress.

## INTRODUÇÃO

O uso da reprodução assistida é hoje uma prática comum na produção animal, e visa aumentar e acelerar a multiplicação de animais de mérito genético superior que melhor expressam características econômicas importantes.

A primeira técnica de reprodução assistida utilizada em bovinos foi a inseminação artificial (IA) na década de 40. Desde então, várias outras biotécnicas foram desenvolvidas visando a melhor exploração de características genéticas das fêmeas.

Com o nascimento do primeiro bezerro oriundo da fecundação *in vitro*, em 1981 (Brackett et al., 1982) a possibilidade de melhor utilização de fêmeas superiores se tornou concreta. A partir de então, a eficiência dessa técnica tem aumentado substancialmente, e está sendo utilizada em grande escala para produção de embriões de fêmeas de várias idades e em vários estados fisiológicos, tanto na pesquisa quanto comercialmente. O interesse crescente da produção *in vitro* de embriões é devido à possibilidade de aumentar rapidamente a produção de uma fêmea, visto que o número de produtos obtidos supera ao de transferência de embriões convencional. Além disso, essa técnica é uma ferramenta essencial para o estudo de várias outras biotécnicas como a clonagem e a injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI).

Entretanto, a utilização da produção *in vitro* (PIV) de embriões para aumentar a produtividade tem sido limitada pelo seu alto custo, que por sua vez é devido, principalmente, às baixas taxas de blastocisto obtidas. Existem inúmeras evidências de que os embriões produzidos *in vitro* são inferiores qualitativamente aos produzidos *in vivo* (Takahashi et al., 2000, Khurana e Niemann, 2000, Lonergan et al., 2003). Várias diferenças entre as duas categorias de embrião tem sido descritas tais como menor quantidade de células, maior quantidade de lipídios, alterações cromossômicas, menor criotolerância e menor taxa de prenhez, em relação aos embriões PIV (Rizos et al., 2002b).



Apesar de todo o avanço alcançado desde os primeiros estudos, os resultados da produção de embriões são baixos e tem se mantido em torno de 40% (Pereira et al., 2003). Sabe-se que a qualidade do ovócito é um fator fundamental para determinar a proporção de ovócitos imaturos que chegam a blastocisto, mas por outro lado, o ambiente de cultivo após a fecundação também pode ter um efeito drástico no desenvolvimento e na qualidade do embrião. Portanto, melhorar as condições de cultivo pela identificação de fatores, substâncias e mecanismos envolvidos no desenvolvimento embrionário é fundamental para aproximar a eficiência desse processo àquela obtida na produção *in vivo*.

Vários fatores podem influenciar o ambiente de cultivo, tais como: composição do meio, presença de soro fetal, a quantidade de embriões cultivados por volume de meio e a atmosfera gasosa (Khurana e Niemann, 2000). Dentre esses fatores o estresse oxidativo causado pela alta tensão de oxigênio utilizada durante o cultivo tem recebido especial atenção nos últimos anos (Ali et al., 2003, Bedaiwy et al., 2004, Fatehi et al., 2005).

Uma das grandes diferenças entre o ambiente *in vivo* e o *in vitro* é a tensão de oxigênio, visto que no oviduto e no útero a tensão de oxigênio é menor do que a utilizada nos sistemas de cultivo embrionário *in vitro* (Van Soom et al., 2002). Tem sido demonstrado que a diminuição na tensão de oxigênio de 20% para 5% aumenta a taxa de desenvolvimento embrionário *in vitro* em várias espécies (Takahashi et al., 2000; Guérin et al., 2001; Yuan et al., 2003; Kitagawa et al., 2004). Esses resultados indicam que altas concentrações de oxigênio durante o cultivo afetam o desenvolvimento, provavelmente, devido ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) no citoplasma das células dos embriões.

Atualmente a maioria dos sistemas de cultivo para embriões bovinos produzidos *in vitro* utiliza o meio SOFaaci em atmosfera com baixa tensão de oxigênio (Lonergan et al., 1999; Hashimoto et al., 2000, Van Soom et al., 2002, Ali et al., 2003; Luciano et al., 2005). Esse sistema elimina a necessidade de co-cultivo com células somáticas, mas por outro lado, eleva o custo de produção e aumenta a manipulação pós-fecundação. Isto porque, para que se possa manter a atmosfera de 5% de oxigênio, é necessária a utilização de 5% de CO<sub>2</sub>, normalmente utilizado, e de

90% de nitrogênio. Sendo assim, nesse sistema é necessário retirar as células do *cumulus* após a fecundação, submetendo os zigotos a um estresse que pode afetar a sua capacidade de desenvolvimento.

Resultados em nosso laboratório têm demonstrado que o meio SOFaaci pode ser utilizado em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> em ar (alta tensão de oxigênio) com altas taxas de produção de blastocisto e sem a necessidade da retirada de células após a fecundação (Pereira et al., 2005). Acredita-se que as células do *cúmulus* que permanecem com o zigoto e que são mantidas durante todo o cultivo funcionem como um “varredor” retirando substâncias tóxicas do meio de cultivo (Fujitani et al., 1997). Dessa forma, o estresse oxidativo causado pela alta tensão de oxigênio seria minimizado pela presença dessas células, de forma que a produção e a qualidade dos embriões seriam similares em ambos os sistemas de cultivo.

Portanto, o presente estudo teve por objetivo comparar dois sistemas de cultivo, um com alta tensão de oxigênio (O<sub>2</sub>) e outro com baixa tensão de O<sub>2</sub>, avaliando a quantidade e qualidade dos embriões PIV.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

#### Maturação *in vitro*

Os ovócitos encontram-se no interior de folículos ovarianos que são formados em ovários de fêmeas mamíferas durante a vida fetal. A população destes folículos ovarianos é muito vasta em todos os mamíferos, e foi estimada, em 130.000 para bovinos de raça europeia (Erickson, 1966) e 70.500 para zebuínos (Lucci et al., 2002). Para a maioria dos mamíferos, no nascimento, estes ovócitos se encontram em prófase I, e somente após a puberdade, pela ação hormonal, ocorre a retomada da meiose e sofrem a maturação ovocitária (Hafez & Hafez, 2004; Gonçalves, et al., 2001). Portanto, após a puberdade, a liberação de hormônios gonadotróficos (LH e FSH) antes da ovulação estimulam os ovócitos a retomarem a meiose e atingirem a metáfase II, expulsando o 1º corpúsculo polar.

O desenvolvimento *in vitro* de ovócitos bovinos imaturos até o estágio de blastocisto ainda é limitado (30-40%) quando comparado a ovócitos maturados *in vivo* (Lonergan et al., 2003), o que se deve à competência dos ovócitos, que é maior quando os mesmos são maturados *in vivo*. A cinética de desenvolvimento de embriões oriundos de ovócitos maturados *in vivo* é mais lenta, mas já em D6, não se observa diferença na porcentagem de embriões entre ovócitos maturados *in vivo* (22,4%) e *in vitro* (23,2%) (Lonergan et al., 2004). Sirard et al. (2006) definiram como ovócito competente, aquele capaz de completar a meiose, clivar após a fecundação, formar blastocisto e desenvolver um indivíduo normal após o nascimento, e para isso a maturação deve ser completa, alcançando as três etapas: nuclear e citoplasmática.

O processo de maturação nuclear envolve a retomada da meiose, culminando com a expulsão do 1º corpúsculo polar. *In vitro*, esta fase é reiniciada logo após aspiração do ovócito do ambiente folicular (Lonergan et al., 2003), iniciando com a

quebra da vesícula germinativa (Sirard & First, 1988). Quando os ovócitos são puncionados, é necessário colocá-los rapidamente em meio de cultivo adequado ou inibir sua maturação com fluido folicular ou proteínas inibidoras. Após 22-24h de maturação *in vitro* aproximadamente 80% dos ovócitos possuem o corpúsculo polar (Lonergan et al., 2003; Mastromonaco et al., 2004).

Durante a maturação nuclear, as enzimas quinases e fosfatases desencadeiam uma cascata de fosforilação e desfosforilação que atuam no fator promotor de maturação (MPF), que é responsável pela retomada e o término da maturação de ovócitos de mamíferos (Nurse, 1990; Gonçalves et al., 2001). O MPF apresenta uma baixa atividade quando o ovócito está em fase de vesícula germinativa, ocorrendo um aumento gradativo no decorrer da meiose, atingindo a atividade máxima no estágio de metáfase I (MI). Após este pico, a atividade de MPF cai abruptamente, nos estágios de anáfase I (AI) e telófase I (TI). No momento que atinge a metáfase II (MII) há um novo aumento da atividade de MPF que é mantido por várias horas após a maturação do ovócito e, gradativamente, diminuem logo após a fecundação (Gonçalves et al., 2001).

A maturação inclui também, mudanças citoplasmáticas, tanto estruturais quanto bioquímicas, para alcançar o sucesso no desenvolvimento embrionário (Senbon et al., 2004). A reorganização citoplasmática inclui o aumento das gotículas de lipídios, reserva energética para o provável embrião; alterações no Complexo de golgi; as mitocôndrias imaturas que tinham o formato arredondado ficam ovaladas, indicando uma maturação mitocondrial; e migração centrípeta dos grânulos corticais, para evitar a polispermia no momento da fecundação (Hyttel et al., 1997; Merton et al., 2003). Acredita-se que maturação citoplasmática de ovócitos maturados *in vivo* seja mais eficiente do que ovócitos maturados *in vitro* (Sirard & Blondin, 1996) justificando a diferença de taxa de blastocisto na produção dos dois sistemas (46,5% de blastocisto de ovócitos cultivados *in vitro* vs. 58,2% de blastocisto de ovócitos cultivados *in vivo* – Rizos et al., 2002a).

No entanto, no processo de maturação *in vitro* (MIV), os ovócitos possuem apenas 24 h para finalizar todo seu processo de maturação e são provenientes de folículos de 2 a 6 mm (Sirard et al., 1992). Assim, é possível que ovócitos maturados

*in vitro* não adquiram uma competência máxima devido à sua incompleta capacitação, um processo no qual estão sendo sintetizadas proteínas, RNA e outras moléculas (Hyttel et al., 1997). A qualidade do ovócito é um fator determinante para a formação do embrião após a fecundação (Sirard & Bondin, 1996), e essa qualidade é influenciada pelo ambiente interno do folículo (Lonergan et al., 2003). O tamanho dos ovócitos também determina sua competência para a fecundação. Os ovócitos aumentam seu diâmetro até quando o folículo atingir 3 mm de diâmetro. Entre 3 e 15 mm de diâmetro folicular, o ovócito não altera mais o seu tamanho (Merton et al., 2003). Ovócitos puncionados de folículos grandes, > 6 mm, são mais competentes em relação a ovócitos de folículos pequenos, 2-6 mm e possuem maior potencial para gerar embrião (Lonergan et al., 1994; Lequarre et al., 2005). Lonergan et al. (2003) mostraram que a taxa de blastocisto em D8, de ovócitos maturados *in vivo*, foi maior que a de ovócitos maturados *in vitro*, proveniente de folículos de 2-6 mm ou > 6 mm. Ovócitos oriundos de folículos pequenos originam embriões com atraso na formação de cavidade, indicando baixa qualidade embrionária (Lequarre et al., 2005). Para *Bos indicus* o tamanho do folículo não influenciou a capacidade dos ovócitos de reiniciarem e completarem a meiose, e de clivarem após a maturação e fecundação *in vitro* (Dode et al., 2000).

A presença e aparência das células do *cumulus* do ovócito são de fundamental importância para o sucesso da maturação do ovócito. A classificação morfológica do ovócito, em qualidade I, II, III e IV leva também em consideração estes parâmetros relacionados com as células do *cumulus*. Para ser classificado como qualidade I os ovócitos têm mais de três camadas de células compactas que os envolvem completamente, e o citoplasma homogêneo. Os ovócitos qualidade II também têm no mínimo três camadas de células compactas os envolvendo, porém o citoplasma com granulações finas. Já os ovócitos qualidade III têm menos de três camadas de células, que podem estar expandidas e/ou não os envolvendo completamente, além do citoplasma com pigmentações e/ou vacúolos e pigmentações. Ovócitos classificados como qualidade IV, são os desnudos, atresicos e degenerados. As células do *cumulus* possuem um papel essencial nas primeiras horas de maturação (Merton et al., 2003) e protegem o ovócito do estresse oxidativo durante o processo de maturação (Yuan et al., 2005). Para Eckert and Niemann (1995), tanto ovócitos de qualidade I quanto os de qualidade II não

mostraram diferença na taxa de blastocisto. Fatehi et al. (2005) observaram que a taxa de clivagem e formação de blastocisto foram menores em ovócitos desnudos fertilizados *in vitro* em relação aos ovócitos com *cumulus* intacto. A remoção das células do *cumulus* também prejudicou a retomada da meiose (Sirard & First, 1988). As células do *cumulus* estão intimamente ligadas ao ovócito por junções comunicantes que são importantes para a passagem de nutrientes (Nagai, 2001) e componentes químicos reguladores da maturação do ovócito. Durante a fase de maturação, são secretados hormônios endógenos e fatores promotores produzidos pelo ovócito que estimulam a síntese de ácido hialurônico, pelas células do *cumulus*, induzindo a sua expansão (Gonçalves et al., 2001).

Para a maturação *in vitro* de ovócito bovino em geral, é utilizado o meio base para cultivo de tecido (TCM 199) com sais de EARLE'S (Ayoub & Hunter, 1993), sendo que o SOF (fluido sintético do oviduto) também tem sido utilizado para a MIV (Ali et al., 2003), sendo que sua indicação principal seja para o cultivo embrionário. O meio de maturação pode ser modificado de acordo com os protocolos de cada laboratório, suplementado-o com fonte energética, glicose e piruvato; fonte protéica, soro fetal bovino e BSA ou macromoléculas sintéticas, álcoolpolivinílico (PVA), polivinilpirrolidone (PVP) – (Ali & Sirard, 2002) bicarbonato de sódio, L-glutamina, HEPES e hormônios LH, FSH (Gonçalves, et al., 2001) e estradiol. Além da composição do meio, outros fatores como o pH, a osmolaridade, a composição iônica, a temperatura da estufa (38,5° / 39°C) e a tensão de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> (Nagai, 2001) são importantes para que a maturação ocorra com sucesso.

### **Fecundação *in vitro***

O processo de fecundação do ovócito bovino envolve várias etapas. Primeiramente, o espermatozóide precisa ter motilidade, capacidade de sofrer o processo de capacitação, reconhecer receptores na zona pelúcida do ovócito, se ligar na membrana plasmática do ovócito e, então penetrar no citoplasma. Para impedir a polispermia, os grânulos da cortical localizados na periferia do ovócito liberam enzimas que causam enrijecimento da zona pelúcida. Após a

descondensação da cromatina da cabeça do espermatozóide, ocorre a formação dos pró-núcleos, a singamia e a formação de um novo indivíduo (Gordon, 1994).

A capacitação envolve uma série de reação bioquímicas e fisiológicas na membrana plasmática do espermatozóide culminado na reação acrossômica, e aumento da sua afinidade pela zona pelúcida do ovócito, propiciando a fecundação.

A técnica de seleção de espermatozóide é aplicada rotineiramente para a realização de fecundação *in vitro*. Este método é utilizado com objetivo de remover o plasma seminal, o crioprotetor e selecionar os espermatozóide de melhor qualidade (Parrish et al., 1995). A separação por gradiente de densidade (Percoll), e o método de migração de espermatozóide pelo swim-up são as técnicas mais utilizadas para a seleção de espermatozoides viáveis, porém outras técnicas como a lavagem do sêmen também pode ser utilizada sem afetar o sucesso na fecundação *in vitro*. O gradiente de Percoll proporciona uma maior recuperação de espermatozoides móveis quando comparado com o swim-up, entretanto a qualidade e viabilidade dos espermatozoides recuperados é semelhante em ambos os métodos. Dode et al. (2002a) não encontraram diferença no método de seleção, em relação à taxa de penetração e clivagem, para as três técnicas utilizadas, sendo o gradiente Percoll, swim-up e lavagem. Ao contrário, Mendes et al. (2003) obtiveram melhores resultados com a utilização do gradiente Percoll. Possivelmente, a explicação para os resultados satisfatórios entre as várias técnicas de seleção seja a concentração do sêmen utilizada na FIV, que pode ter superado as diferenças na qualidade do mesmo (Dode et al., 2002a). Porém acredita-se que a centrifugação (Watson, 2000), utilizada em todas as técnicas de seleção descritas, pode causar danos oxidativos (produção de ROS) aos espermatozoides, além disso, o tempo de co-incubação com os ovócitos também pode levar a um aumento da produção destes radicais, causando danos tanto a ovócitos e espermatozoides, quanto aos embriões produzidos (Kim et al., 1999).

Talvez mais importante que a seleção dos espermatozoides seja a capacitação destas células, pois sem esta etapa os espermatozoides não estarão aptos a penetrar a zona pelúcida do ovócito. A capacitação, normalmente é induzida *in vitro* pela adição de substâncias como a heparina. Mendes et al. (2003) confirmam

esta afirmativa, pois a adição de heparina no meio de fecundação melhorou significativamente as taxas de clivagem e produção de embriões, quando comparados com a ausência desta substância, utilizando diferentes protocolos de seleção de espermatozóides.

O período de tempo utilizado na fecundação também é um aspecto importante a ser considerado para melhorar os resultados da FIV. Dode et al. (2002a) obtiveram melhores taxas de penetração e clivagem quando ovócitos e espermatozóides foram co-incubados entre 12-18 horas. O ambiente de cultivo comumente utilizado (5% de CO<sub>2</sub> em ar) juntamente com o tempo de co-incubação pode levar a um aumento na geração de ROS (Kim et al., 1999; Boquest et al., 1999), causando estresse oxidativo às células e prejudicando a formação de embriões.

### **Cultivo *in vitro***

Os primeiros resultados com o cultivo *in vitro* de embriões até o estágio de blastocisto, ocorreram em 1959, em coelhos (Gordon, 1994). Desde então, os avanços têm proporcionado resultados cada vez melhores no cultivo *in vitro*, apesar de ainda estarem distantes dos alcançados na produção *in vivo*. A qualidade do embrião é a principal diferença entre a produção *in vivo* e *in vitro*. Embriões produzidos *in vitro* têm qualidade inferior (Rizos et al., 2002b), entretanto estudos vem sendo desenvolvidos visando aprimorar as técnicas para tentar chegar o mais próximo possível da produção *in vivo*, em termos de qualidade. Rizos et al. (2002a) mostraram que embriões oriundos de ovócitos maturados e fecundados *in vitro* e cultivados *in vivo*, em oviduto de ovelha, têm qualidade muito próxima aos embriões produzidos *in vivo*.

O sistema de co-cultivo com células somáticas auxiliou o desenvolvimento da técnica de cultivo *in vitro* (Gordon, 1994). Essas células mostraram serem capazes de proporcionar um ambiente onde os embriões poderiam se desenvolver. Diferentes tipos de células somáticas podem ser utilizadas nos sistemas de co-



cultivo, como células de oviduto, células de rim de macaco verde (VERO), células de fígado de rato búfalo (BRL), células do *cumulus* e células da granulosa (Luciano et al., 2005).

Segundo Bavister et al. (1992), um dos motivos pelos quais utiliza-se o sistema de co-cultivo é a capacidade que as células somáticas têm de retirar embriotoxinas do meio de cultivo e/ou produzir substâncias embriotróficas que auxiliem no desenvolvimento dos embriões.

Outro ponto importante a ser observado é a suplementação do meio de cultivo. Diferentes substâncias podem ser usadas na suplementação, como albumina (BSA), soro fetal e macromoléculas como polivinilpirrolidone (PVP) e álcool polivinílico (PVA) (Wrenzychi et al., 2001). O inconveniente de se utilizar BSA ou soro é o fato de serem duas substâncias de composição complexa e indefinida, enquanto as macromoléculas tornam o meio definido.

Da mesma forma, o tipo de meio utilizado é também importante para o desenvolvimento embrionário. Wrenzychi et al. (2001) e Dode et al. (2002b) compararam dois tipos de meio, sendo TCM 199 e SOF, encontrando produção satisfatória em ambos (aproximadamente 35% de blastocisto), no cultivo de embriões bovinos. Deve-se também destacar a importância da atmosfera gasosa, pois o oxigênio do ambiente geralmente é tóxico para a maioria dos tipos celulares, já que aumenta a produção de radicais livres, apesar das células produzirem naturalmente um antioxidante, a glutatona. Vários autores afirmam que a produção sob baixa tensão de O<sub>2</sub> melhora a qualidade dos embriões, que sofreram menos efeitos do estresse oxidativo (Takahashi et al., 2000, Yuan et al., 2003, Kitagawa et al., 2004), enquanto outros acreditam que tanto em alta, quanto em baixa tensão de O<sub>2</sub> a produção e qualidade dos embriões não mudam quando o co-cultivo é utilizado (Khurana e Niemann, 2000).

## EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES

Embriões produzidos *in vitro* (PIV) apresentam várias diferenças em relação àqueles produzidos *in vivo* (Lonergan et al., 2003). Entre elas podemos citar a quantidade de lipídios, a criotolerância, o número de células apoptóticas, anormalidades cromossômicas, diferenças no metabolismo, entre outras. Todos esses fatores fazem com que a qualidade dos embriões PIV seja inferior aos produzidos *in vivo* (Rizos et al., 2002a; Lonergan et al., 2003). Alguns parâmetros podem também ser utilizados para avaliar a qualidade dos embriões, tais como a coloração dos blastômeros, a cinética de desenvolvimento, o diâmetro do embrião ao eclodir, e o número total de células (Lonergan et al., 2006). Porém, os melhores indicativos de qualidade embrionária são a capacidade de estabelecer a prenhez, e o nascimento da cria (Rizos et al., 2002a).

O ambiente de cultivo influencia a produção e a qualidade dos embriões PIV. Apesar da qualidade do ovócito ser o fator determinante para que o embrião PIV possa chegar ao estágio de blastocisto, as condições de cultivo podem influenciar, principalmente, a qualidade dos embriões (Lonergan et al., 2003).

As condições de cultivo envolvem vários fatores, como o tipo de meio, a atmosfera gasosa, a densidade, ou seja, a quantidade de embriões / volume de meio, a presença ou não de co-cultivo e o tipo de suplementação protéica (Wrenzycki et al., 2001; Oliveira et al., 2005; Donnay et al., 1997; Kitagawa et al., 2004).

Embriões são capazes de se desenvolver em meios de cultivo diferenciados, ou seja, desde simples soluções de sais balanceadas até complexos sistemas envolvendo co-cultivo e soro (Lonergan et al., 2006), com correspondente potencial de desenvolvimento, taxas de prenhez e nascimentos. Vários tipos de meios de cultivo têm sido utilizados, tais como TCM 199, CR1, CR2 e SOF. O TCM 199 pode ser definido como um meio de cultivo complexo desenvolvido para o cultivo celular em geral (Tervit et al., 1972), enquanto o SOF seria um meio simples, direcionado para a produção de embriões. Wrenzycki et al. (2001) avaliaram a produção de

embriões, utilizando no cultivo dois tipos de meios básicos, o TCM 199 e o SOF, não encontraram diferença significativa na clivagem, e na produção de mórulas e blastocistos. Os autores sugerem que o SOF proporciona um ambiente de cultivo melhor que o TCM 199, devido às diferenças no padrão de expressão de genes importantes na pré-implantação de embriões cultivados em ambos os tipos de meios.

A suplementação do meio de cultivo também tem sido demonstrado que influencia a produção e a qualidade dos embriões. Os meios de cultivo básicos, em geral, são suplementados com soro fetal ou albumina sérica bovina (BSA), que são misturas complexas indefinidas, e que resultam em uma grande variação nos resultados de produção (Wrenzycki et al., 2001.). Para padronizar os meios, os componentes indefinidos podem ser substituídos por macromoléculas, como o PVA ou PVP (Jones et al., 1998). Muitos estudos têm mostrado que a presença de soro no cultivo pode ter um efeito duplo, inibindo as clivagens iniciais e posteriormente aumentando a velocidade de desenvolvimento do embrião até o estágio de blastocisto (Rizos et al., 2002b). Rizos et al. (2003) avaliaram a produção de embriões na presença de soro fetal (10%) e BSA em duas concentrações (3% e 16%) e não encontraram diferença na taxa de clivagem entre os grupos, porém em D6 houve maior produção de blastocisto na presença de soro (20% de BL), comparado a 3% ou 16% de BSA (4% e 11% de BL, respectivamente). Entretanto, a taxa de blastocisto em D7 foi semelhante para todos os grupos, demonstrando o efeito do soro em acelerar o desenvolvimento embrionário. Wrenzycki et al. (2001) utilizando meio suplementado com soro fetal, BSA ou PVA, também não encontraram diferenças na taxa de clivagem, porém a produção de mórulas e blastocistos foi significativamente maior no meio suplementado com soro, que no suplementado com BSA ou PVA. Ferguson et al. (1999) e Thompson et al. (1995), citados por Rizos et al. (2003) sugerem que a presença de soro no meio de cultivo está relacionado com o aumento na quantidade de lipídios nos embriões PIV, o que reduz sua criotolerância.

A densidade, ou o número de embriões cultivados por volume de meio, também afeta a eficiência do sistema de produção. Embriões bovinos produzidos em grupo adquirem maior competência para o desenvolvimento do que embriões

cultivados individualmente (Donnay et al., 1997). Pereira et al. (2005), não encontraram diferença significativa entre a produção de embriões bovinos em grupo ou individualmente, porém observaram que embriões produzidos individualmente tendem a ter um menor número de células, podendo ser considerado de qualidade inferior. Já Oliveira et al. (2005) encontraram diferença na produção de embriões, sendo que quando o cultivo foi feito com 30 estruturas em 100µl de meio de cultivo, a produção foi menor quando comparados com 5, 10 e 20 estruturas no mesmo volume de meio. Os autores sugerem que a maior densidade pode proporcionar maior produção de substâncias embriotóxicas no meio de cultivo, prejudicando assim, o desenvolvimento dos embriões.

Outro fator importante para alcançar a eficiência no sistema de cultivo *in vitro* é a presença ou ausência de co-cultivo. O co-cultivo pode ser realizado com vários tipos de células somáticas: células epiteliais do oviduto, células BRL, células VERO, células do *cumulus* ou da granulosa. Lim et al. (1996) comparando o cultivo na presença ou ausência de células do *cumulus*, obtiveram maior produção quando os embriões foram cultivados na presença das células. Resultados semelhantes foram relatados por Donnay et al. (1997), que obtiveram maior taxa de produção de embriões em co-cultivo com células do *cumulus* ou células BRL comparados com a ausência de co-cultivo. De acordo com Bavister et al. (1992), o efeito positivo do co-cultivo e do cultivo em grupo pode ser explicado pela neutralização de fatores embriotóxicos, e pela secreção de fatores embriotróficos no meio de cultivo durante o cultivo embrionário.

Além de propiciar um ambiente para o desenvolvimento dos embriões, as células do co-cultivo protegem os ovócitos e embriões contra o estresse oxidativo provocado pelas condições de cultivo, proporcionando maior produção embrionária (Kim et al., 1999 e Fatehi et al., 2005).

A atmosfera gasosa é outro aspecto importante no ambiente em que ocorre o cultivo dos embriões. A tensão de O<sub>2</sub> tem grande influência na produção e na qualidade dos embriões, principalmente devido ao estresse oxidativo que causa às células, por aumentar a produção ROS, visto que a tensão de oxigênio no oviduto (entre 5-8%) é menor que a utilizada no cultivo embrionário *in vitro* (20%) (Fisher e

Bavister, 1993). Avaliando a produção de embriões bovinos, Khurana e Niemann (2000) não encontraram diferença significativa quando esses foram cultivados sob 5% ou 20% de O<sub>2</sub>. Entretanto, em suínos, um aumento na produção de embriões foi observado quando o cultivo foi realizado em baixa tensão de O<sub>2</sub> (5%) comparado com alta tensão (20%) (Kitagawa et al., 2004), assim como em bovinos (Lonergan et al., 1999; Yuan et al., 2003).

O efeito do ambiente de cultivo pós-fecundação na expressão de genes relacionados ao desenvolvimento embrionário tem sido avaliado em blastocistos no final do período de cultivo (Wrenzyki et al., 2001; Rizos et al., 2002a; Lonergan et al., 2006). O período de pré-implantação é uma etapa crítica do desenvolvimento embrionário. No entanto, os embriões têm capacidade de se adaptar às condições de cultivo, e esta sensibilidade pode levar a alterações nas características do feto e no desenvolvimento e crescimento pós-natal (Lonergan et al., 2006). Muitas informações demonstram que o ambiente de cultivo pós-fecundação tem grande influência na expressão gênica dos embriões, podendo ter sérias conseqüências na normalidade destes embriões (Lonergan et al., 2003), como por exemplo, alterações no reconhecimento materno-fetal e na diferenciação e implantação do embrião (Rizos et al., 2003), além da ocorrência da síndrome do bezerro grande (McEvoy et al., 2001, Wrenzyki et al., 2001). Rizos et al. (2002b), utilizando cultivo pós-fecundação *in vitro* e *in vivo*, em oviduto de ovelha, encontraram embriões de melhor qualidade em relação à criotolerância quando cultivados *in vivo*.

Durante o desenvolvimento embrionário, o padrão da expressão gênica tem fundamental importância para o metabolismo embrionário em diferentes etapas, como as clivagens iniciais, a ativação genômica que ocorre no estágio entre 8-16 células, a compactação da mórula e a formação do blastocisto e/ou diferenciação celular (Watson, 1992). Alterações no padrão de expressão gênica, podem afetar a viabilidade dos embriões. Especial atenção deve ser dada, portanto, aos embriões PIV, pois o sistema de cultivo pode influenciar drasticamente o padrão de expressão de determinados genes. Rizos et al. (2002a) avaliaram a expressão de vários genes envolvidos em processos importantes durante o desenvolvimento embrionário, como apoptose (Bax), comunicação celular (Cx43) e estresse oxidativo (SOX). Esses autores encontraram diferenças na expressão desses genes entre embriões

derivados de ovócitos maturados e fecundados *in vitro* e cultivados *in vitro* e *in vivo*. Embriões cultivados *in vitro* apresentaram menores níveis de expressão para o gene relacionado com a comunicação celular, porém maior transcrição para o gene de apoptose e do estresse, demonstrando as diferenças entre os dois tipos de embriões. Rizos et al. (2003) avaliaram também a expressão gênica de genes como SOX, Bax, interferon- $\tau$ , e LIF relacionados com estresse oxidativo, apoptose, reconhecimento materno-fetal e diferenciação e implantação, respectivamente, em embriões produzidos na presença ou ausência de soro fetal e encontraram aumento nos níveis de expressão para os genes SOX, Bax e LIF, e diminuição na expressão para o interferon- $\tau$  em embriões produzidos na presença de soro. Esta diferença na expressão afetou o nível de criotolerância desses embriões. Embriões cultivados com soro apresentaram menor criotolerância. Já Wrenzycki et al.(2001) avaliando a expressão gênica em embriões produzidos em dois sistemas de cultivo, sendo TCM 199 e SOF, encontraram maiores níveis de expressão em embriões produzidos no TCM 199, para genes relacionados com a compactação e formação da blastocela, porém consideraram o meio SOF mais adequado ao cultivo embrionário.

## EFEITO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO EMBRIÃO PIV

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são formadas a partir das reações de redução do oxigênio ( $O_2$ ), e constituem parte dos radicais livres. Os principais ROS são os radicais superóxido ( $O_2^-$ ) e hidroxil (OH), e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que correspondem à redução por um, três e dois elétrons, respectivamente (Guérin et al., 2001). A produção de radicais livres faz parte da fisiologia da célula, porém em excesso podem causar danos às mesmas, levando ao estresse oxidativo.

A produção de ROS pode ter origem diretamente a partir de gametas e embriões, ou através do ambiente, e se refere à produção dos radicais  $O_2^-$ , OH e o  $H_2O_2$ . Além disso, a produção desses radicais durante o cultivo *in vitro* é diferenciada, de acordo com o estágio de desenvolvimento, sendo que zigotos e blastocistos são mais sensíveis às ROS, enquanto embriões entre 9-16 células são mais resistentes (Guérin et al., 2001).

Vários fatores podem contribuir para aumentar a produção das ROS, entre eles pode-se destacar, a concentração de oxigênio, o contato com a luz, o excesso de manipulação e os espermatozoides.

A tensão de  $O_2$  utilizada nos sistemas de cultivo pode ser até quatro vezes maior que a do oviduto, elevando a atividade das oxidases, e conseqüentemente a quantidade de radicais  $O_2^-$  no meio (Guérin et al., 2001), o que pode afetar a quantidade dos embriões produzidos. Para avaliar o efeito da tensão de oxigênio na produção de embriões suínos, Kitagawa et al. (2004) utilizaram 5 % e 20% de  $O_2$  no cultivo *in vitro* e encontraram maior taxa de produção quando a tensão foi menor. Neste mesmo estudo, a produção de ROS também foi avaliada nos dois ambientes de cultivo através da quantificação de  $H_2O_2$  produzida no meio, que se apresentava em menor concentração quando o cultivo foi feito sob 5% de  $O_2$ . Yuan et al. (2003), também avaliaram a produção de embriões, porém bovinos, sob 5% e 20% de  $O_2$ , e em seus resultados mostraram maior taxa de produção até a fase de mórula, sob alta tensão de oxigênio, sendo que em D7 os resultados se inverteram, resultando numa maior produção de blastocistos sob baixa tensão de  $O_2$ , além disso, a

quantidade de células apoptóticas nos embriões produzidos sob 20% de O<sub>2</sub> foi maior.

O excesso de exposição à luz visível durante a manipulação também pode induzir a produção de ROS pelas células dos embriões (Guérin et al., 2001). Goto et al. (1993) observaram um aumento na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em embriões de camundongo expostos à luz por mais de cinco minutos, ou seja, o tempo gasto para qualquer procedimento no laboratório de PIV.

Uma alteração na produção de ROS também pode ocorrer durante a fecundação, prejudicando o desenvolvimento dos zigotos e embriões. O período de incubação dos gametas masculino e feminino pode desencadear um aumento na produção de ROS pelos espermatozoides, prejudicando a formação dos pronúcleos (Alvarez et al., 1996). Bedaiwy et al (2004) avaliando a produção e desenvolvimento de embriões humanos *in vitro*, verificaram que, quando o tempo de incubação é reduzido, durante a fecundação, juntamente com a adição de vitaminas C e E no meio FIV, a produção de embriões foi maior, e possivelmente devido à menor produção de ROS.

O estresse oxidativo é responsável por diferentes tipos de danos nas células dos embriões devido a produção de ROS, e estes danos podem alterar várias moléculas, como lipídios, proteínas e ácidos nucléicos. O aumento na produção de ROS induz a peroxidação lipídica (com efeito direto nas divisões celulares, no transporte de metabólitos e disfunção mitocondrial), leva à oxidação de proteínas, e automaticamente à inativação de enzimas, além de induzir a fragmentação das fitas de DNA nuclear. As conseqüências desses danos oxidativos podem ser evidenciados no desenvolvimento retardado dos embriões, nas disfunções metabólicas e até mesmo no aumento e aceleração da apoptose (Guérin et al., 2001). Kitagawa et al. (2004), avaliando a fragmentação do DNA de embriões suínos sob diferentes tensões de O<sub>2</sub> e na presença de antioxidantes ( $\beta$ -mercaptoetanol e vitamina E), verificaram que danos menores ocorreram nos embriões produzidos sob baixa tensão de oxigênio. Entretanto, a presença dos antioxidantes no meio reduziu os danos oxidativos quando os embriões foram cultivados em alta tensão de O<sub>2</sub>. O



efeito prejudicial da alta tensão de O<sub>2</sub> na fragmentação do DNA foi confirmado por Takahashi et al. (2000) em embriões bovinos cultivados em 5% e 20% de O<sub>2</sub>.

Um acúmulo de radicais superóxido acompanhado de um declínio da enzima superóxido dismutase (SOD) estão diretamente ligados ao aumento de apoptoses, pois a SOD tem capacidade de inibir a morte celular. Yuan et al. (2003) verificaram maior produção de células apoptóticas em embriões bovinos produzidos sob 20% de O<sub>2</sub>, quando comparados com embriões produzidos sob 5%, sendo este um indicativo da qualidade dos embriões.

Os processos de congelamento e descongelamento também provocam danos aos embriões, causando redução das concentrações de glutathione (um antioxidante natural produzido pelas células) e da atividade da SOD, tornando as células mais sensíveis às ROS (Guérin et al., 2001). Men et al. (2005) avaliando a sobrevivência de embriões suínos PIV, e Rizos et al. (2002b) avaliando a sobrevivência de embriões bovinos PIV, encontraram menor taxa de reexpansão e eclosão nos embriões que passaram pelo processo de congelamento, demonstrando a maior fragilidade dos mesmos. Já Pereira et al. (2005), avaliando a viabilidade de embriões bovinos PIV pós-congelamento, não encontraram diferença significativa entre os embriões congelados e os não congelados, em relação à taxa de eclosão.

Apesar de inúmeros fatores influenciarem ou desencadarem a produção de ROS nas células, ovócitos e embriões, substâncias como o fluido folicular, fluido do oviduto ou enzimas podem ser adicionados aos meios de cultivo durante o processo de produção dos embriões. Estas defesas, chamadas defesas antioxidantes, são definidas como qualquer substância que, quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, retarda ou inibe a oxidação deste (Halliwell and Gutteridge, 1989). Os antioxidantes podem ser divididos em compostos não-enzimáticos (glutathione/GSH, cistina/CSH, taurina e hipotaurina e piruvato, entre outros) e enzimáticos (superóxido dismutase/Cu,Zn e superóxido dismutase/Mn-SOD, catalase, glutathione peroxidase/GPX). É importante destacar que a produção de ROS ocorre durante o metabolismo normal da célula, no entanto, requer que a ativação do sistema de reparo ao estresse oxidativo entre em ação tão logo ocorram danos às células, do contrário não será eficiente. Matos et al. (2002),

avaliando o efeito da estimulação da síntese de GSH durante a MIV de ovócitos ovinos, encontraram aumento no conteúdo de GSH intracelular em ovócitos maturados na presença de cisteamina e  $\beta$ -mercaptoetanol, porém a produção de embriões foi significativamente maior apenas nos ovócitos maturados com cisteamina.

Boquest et al. e Kim et al. (1999) avaliando a produção de embriões suínos e bovinos, respectivamente, adicionaram glutathione (GSH) no meio de fecundação, e encontraram significativamente maior produção na presença do antioxidante. Ali et al. (2003) adicionaram diferentes antioxidantes (cisteína, N-acetil-L-cisteína, SOD e catalase) em períodos distintos da produção de embriões, sendo MIV, FIV e cultivo, e encontraram significativamente melhor produção na presença de cisteína durante a maturação e fecundação. Já Kitagawa et al. (2004), avaliando o efeito da concentração de oxigênio e da presença de antioxidantes ( $\beta$ -mercaptoetanol e vitamina E) na produção de embriões suínos, mostraram que a baixa de tensão de  $O_2$  e a adição de antioxidantes na presença de alta tensão de  $O_2$  produziu significativamente mais embriões. Neste mesmo trabalho, avaliaram também a produção de  $H_2O_2$  e confirmaram que a menor tensão de oxigênio produziu menor quantidade de ROS, provocando menos danos oxidativos aos embriões.

Ovócitos e embriões podem ser protegidos contra o estresse oxidativo através de métodos, como a redução da tensão de oxigênio, o co-cultivo com células somáticas, a redução da exposição à luz ou manipulação sob luz filtrada (com filtro especial para ultravioleta) e também pela adição de compostos antioxidantes nos meios de cultivo, como enzimas (SOD), metais quelantes (EDTA), compostos tiols (GSH,  $\beta$ -mercaptoetanol, CSH), proteínas (albumina) e vitaminas (C,E), levando-se em conta que, da mesma forma que os antioxidantes são benéficos, podem se tornar prejudiciais, quando administrados em excesso. Devem ser utilizados para manter um equilíbrio entre antioxidantes e pro-oxidantes nas células (Guérin et al., 2001). Fatehi et al. (2005) verificaram que a presença de co-cultivo com células do *cumulus* protege os ovócitos das espécies reativas de oxigênio, e conseqüentemente, induz uma maior produção de embriões bovinos.

## **OBJETIVO GERAL**

O objetivo do presente estudo foi testar a eficiência de dois sistemas de cultivo, sendo alta e baixa tensão de oxigênio, para a produção, a qualidade e a expressão de genes relacionados com estresse oxidativo em embriões produzidos *in vitro*.

## **HIPÓTESE**

O sistema de cultivo utilizando alta tensão de oxigênio (20%) na presença de células do cúmulus é tão eficiente para a produção de embriões *in vitro* quanto o sistema que utiliza a baixa tensão (5%) sem a presença dessas células.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, A. & SIRARD, M.A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation. **Biol.of Reprod.**, v. 66, p.901-905, 2002.

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

ALVAREZ, J.G.; MINARETZIS, D.; BARRET, C.B et al. The sperm stress test: a novel test that predicts pregnancy in assisted reproductive technologies. **Fertil. Steril.** v. 65, p.400-405, 1996.

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

BAVISTER, B.D. Co-culture for embryo development: is it really necessary? **Human Reprod.** v. 7, p. 1339-1341, 1992.

BEDAIWY, M.A.; FALCONE, T.; MOHAMED, M.S. et al. Differential growth of human embryos *in vitro*: role of reactive oxygen species. **Fertility and Sterility**. v. 82, nº 03, p. 593-600, 2004.

BOQUEST, A.C.; ABEYDEERA, L.R.; WANG, W.H.; DAY, B.N. Effect of adding reduced glutathione during insemination on the development of porcine embryos *in vitro*. **Theriogenology**. v. 51, p. 1311-1319, 1999.

BRACKETT, B.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; et al. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biol. Reprod.** v. 27, p. 147-158, 1982.

DODE, M.A.N.; RODOVALHO, N.C.; UENO, V.G.; ALVES, R.G.O. Efeitos do tamanho do folículo na maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos de fêmeas zebuínas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 207-214, 2000.

DODE, M.A.N.; RODOVALHO, N.C.; UENO, V.G.; FERNANDES, C.E. The effect of sperm preparation and co-incubation time on *in vitro* fertilization of *bos indicus* oocytes. **Animal Reprod. Science**. v. 69, p. 15-23, 2002a.

DODE, M.A.N.; MATTOS, L.; RUMPF, R. *In vitro* production of bovine embryos in SOF medium under high oxygen tension. **Theriogenology**. v. 57, p. 661, 2002b, abstract.

DONNAY, I.; VAN LANGENDONCKT, A.; AUQUIER, P.; GRISART, B.; VANSTEENBRUGGE, A.; MASSIP, A. et al. Effects of co-culture and embryo number on the *in vitro* development of bovine embryos. **Theriogenology**. v. 47, p. 1549-1561, 1997.

ECKERT, J. & NIEMANN, H. *In vitro* maturation, fertilization and cultured to blastocyst of bovine oocytes in protein-free media. **Theriogenology**, v.43, p.1.211 – 1.225, 1995.

ERICKSON, B.H. Development and senescence of postnatal bovine ovary. **J. Anim. Sci.**, v.25, p.800-805, 1966.

FATEHI, A.N.; ROELEN, B.A.; COLENBRANDER, B.; SCHOEVERS, E.J.; GADELLA B.M.; BEVERST, M.M.; VAN DEN HURK, R. Presence of *cumulus* cells during *in vitro* fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. **Zygote**, v.13, p.177-185, 2005.

FISHER, B. BAVISTER, B.D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. **J. Reprod. Fertil.** v. 99, p. 673-679, 1993.

FUJITANI, Y.; KASAI, K.; OHTANI, S. et al.. Effect of oxygen concentration and free radicals on *in vitro* development of *in vitro*-produced bovine embryos. **J. Anim. Sci.** v. 75, p. 483-489, 1997.

GONÇALVES, P.B.D.; VISINTIN, J.A.; OLIVEIRA, M.A.L.; MONTANGER, M.M.; COSTA, L.F.S. In: Produção *in vitro* de embriões. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Livraria Varela, 1 ed, p.195-226, 2001.

GORDON, I.. **Laboratory Production of Cattle Embryos**. Ed. Cab International. 1994.

GOTO, K.; NODA, Y.; MORI, T. et al. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured *in vitro*. **Free Radical Biol. Med.** v. 15, p.69-75, 1993.

GUÉRIN, P.; MOUATASSIM, S. El and MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reprod. Update**. v. 07, nº 02, p. 175-189, 2001.

HAFEZ, E.S.E & HAFEZ, B. Foliculogênese, maturação ovocitária e ovulação. **Reprodução Animal**, São Paulo: Manole, 7 ed, p.69-82, 2004.

HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M.C. The chemistry of oxygen radicals and other derived species. In: Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (eds). **Free Radical in Biology and Medicine**. 2<sup>nd</sup> edn. Clarendon Press, Oxford, p. 22-85, 1989.

HASHIMOTO, S.; MINAMI, N.; TAKAKURA, R. et al. Low oxygen tension during *in vitro* maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine *cumulus*-oocyte complexes. **Mol. Reprod. Devel.** v. 57, p. 353-360, 2000.

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

JONES, G.M.; TROUNSON, A.O.; GARDNER, D.K. et al. Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. **Human Reprod.** v. 13, p. 169-177, 1998.

KIM, I.H.; VAN LANGENDONCK, A.; VAN SOOM, A. et al. Effect of exogenous glutathione on the *in vitro* fertilization of bovine oocytes. **Theriogenology.** v. 52, p. 537-547, 1999.

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.** v. 62, p. 1186-1197, 2004.

KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, *cumulus* cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology.** v. 54, p.741-756, 2000.

LEQUARRE, A.S.; VIGNERON, C.; RIBAUCCOUR, F.; HOLM, P.; DONNAY, I.; DALBIÈS-TRAN, R.; CALLESEN, H.; MERMILLOD, P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristic and embryo development in the bovine. **Theriogenology,** v. 63, p. 841-859, 2005.

LIM, J.M.; ROCHA, A.; HANSEL, W. A serum-free medium for use in a *cumulus* cell co-culture system for bovine embryos derived from *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization. **Theriogenology.** v. 45, p. 1081-1089, 1996.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M.P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. **Mol. Reprod. Devel.,** v. 37, p. 48-53, 1994.

LONERGAN, P.; O'KEARNEY-FLYNN, M.; BOLAND, M.P. Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. **Theriogenology.** v. 51, p. 1565-1576, 1999.

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

LONERGAN, P.; PEDERSEN, H.G.; RIZOS, D.; GREVE, T.; THOMSEN, P.D.; FAIR, T. et al. Effect of the post-fertilization culture environment on the incidence of chromosome aberrations in bovine blastocysts. **Biol Reprod.** v.71, p. 1096-1100, 2004.

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.** v. 65, p. 137-152, 2006.

LUCCI, C.M.; RUMPF, R.; FIGUEIREDO, J.R., BÃO, S.N. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. **Theriogenology**, v.57 (5), p.1467-1483, 2002.

LUCIANO, A.M.; LODDE, V.; BERETA, M.S. et al. Developmental capability of denuded bovine oocyte in a co-cultured system with intact *cumulus*-oocyte complexes: role of *cumulus* cells, cyclic adenosine 3',5'-Monophosphate, and glutathione. **Mol. Reprod. Devel.** v. 71, p. 389-397, 2005.

MASTROMONACO, G.F.; SEMPLE, E.; ROBERT, C.; RHO, G.J.; BETTS, D.H.; KING, W.A. Different culture media requirements of IVF and nuclear transfer bovine embryos. **Reprod. Dom. Animal.** v. 39, p. 462-467, 2004.

MATOS, D.G.; GAPARRINI, B.; PASQUALINI, S.R.; THOMPSON, J.G. Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. **Theriogenology**. v. 57, p. 1443-1451, 2002.

McEVOY, T.G. ; ROBINSON, J.J.; SINCLAIR, K.D. Developmental consequences of embryo and cell manipulation in mice and farm animals. **Reproduction**. v.122, p.507-518, 2001.

MEN, H.; AGCA, Y.; CRITSER, E.S.; CRITSER, J.K. Beneficial effects of serum supplementation during *in vitro* production of porcine embryos on their ability to survive cryopreservation by open pulled straw vitrification. **Theriogenology**. v. 64, p. 1340-1349, 2005.

MENDES Jr., J.O.B.; BURNS, P.D.; De La TORRE SANCHES, J.F.; SEIDEL Jr.; G.E. Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. **Theriogenology**. v. 60, p. 331-340, 2003.

MERTON, J.S.; ROOS, AP.W.; MULLAART, E.; RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS, P.L.A.; DIELEMAN, S.J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryos technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, p.651-674, 2003.

NAGAI, T. The improvement of *in vitro* maturation system for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 55, p. 1.291-1.301, 2001.

NURSE, P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. **Nature**, v.344, p.503-508, 1990.

OLIVEIRA, A.T.D; LOPES, R.F.F.; RODRIGUES, J.L. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced *in vitro* under varying embryo density conditions. **Theriogenology**. v. 64, p. 1559-1572, 2005.

PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up and percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**. v.44, p.859-869, 1995.



PEREIRA, D.C. Avaliação de diferentes sistemas de cultivo na produção *in vitro* de embriões bovinos. **Dissertação de Mestrado da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UnB**, julho, 2003.

PEREIRA, D.C.; DODE, M.A.N.; RUMPF, R. Evaluation of different culture systems on the *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**. v. 63, p. 1131-1141, 2005.

RIZOS, D.; LONERGAN, P.; BOLAND, M.P.; ARROYO-GARCIA, R.; PINTADO, B.; de la FUENTE, J.; GUTIÉRREZ-ADAN, A. Analysis of differential mRNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. **Biol Reprod**. v.66, p.589-595, 2002a.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P.. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Mol. Reprod. Devel**. v. 61, p. 234-248, 2002b.

RIZOS, D.; GUTIÉRREZ-ADAN, A.; PÉREZ-GARNELO, J. et al. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biol. Reprod**. v. 68, p. 236-243, 2003.

SEBON, S.; FUKUMI, Y.; HAMAWAKI, A.; YOSHIKAWA, M.; MIYANO, T. Bovine oocytes grow in serum-free medium acquire fertilization competence. **Journal of Reproduction and Development**, v. 50, n. 5, p.541-547, 2004.

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

SIRARD, M.A.; COENEN, K.; BILODEAU, B. Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 37, p. 39-58, 1992.

SIRARD, M.A and BLODIN, P. Oocyte maturation and IVF in cattle. **Animal Reprod. Science**, v. 42, p. 417 -426, 1996.

SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**. v. 65, p. 126-136, 2006.

TAKAHASHI, M.; KEICHO, K.; TAKAHASHI, H. et al. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in-vitro cultured bovine embryos by comet assay. **Theriogenology**. v. 54, p. 137-145, 2000.

TERVIT, H.R.; WHITTINGHAM, D.G. and ROWSON, L.E.A. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. **J. Reprod. Fertil**. v. 30, p. 493-497, 1972.

VAN SOOM, A.; YUAN, Y.Q.; PEELMAN, L.J.; MATOS, D.G. et al. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen

tensions with or without cysteine addition. **Theriogenology**. v.57, p. 1453-1465, 2002.

YUAN, Y.Q.; VAN SOOM, A.; COOPMAN, F.O.J.; MINTIENS, K. et al. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. **Theriogenology**. v. 59, p. 1585-1596, 2003.

YUAN, Y.Q.; VAN SOOM, A.; LEROY, J.L.M.R.; DEWULF, J.; VAN ZEVEEREN, A.; de KRUIF, A.; PEELMAN, L.J. Apoptosis in *cumulus* cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. **Theriogenology**, v.63, p.2.147 – 2.163, 2005.

WATSON, P.F. The causes of the reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reprod. Science**. v. 60-61, p. 481-492, 2000.

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

## **CAPÍTULO ÚNICO**

### **TENSÃO DE OXIGÊNIO DURANTE O CULTIVO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS: EFEITO NA PRODUÇÃO E EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO**

# TENSÃO DE OXIGÊNIO DURANTE O CULTIVO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS: EFEITO NA PRODUÇÃO E EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO

## RESUMO

Apesar dos avanços obtidos nos últimos anos nas técnicas de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* de embriões bovinos, a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* ainda é inferior a dos *in vivo*. O ambiente de cultivo após a fecundação é importante para a qualidade dos embriões. Dentre os fatores que podem influenciar o ambiente de cultivo, o estresse oxidativo causado pela alta tensão de O<sub>2</sub> tem recebido especial atenção. A maioria dos sistemas de cultivo utilizada para a PIVE usa o meio SOFaaci com atmosfera de 5% de O<sub>2</sub>. Portanto, o presente estudo teve por objetivo comparar a produção de embriões em sistema de cultivo com alta e baixa tensão de O<sub>2</sub>. Um total de 1118 ovócitos obtidos de ovários de abatedouro foram maturados e fecundados *in vitro*. Vinte horas após a inseminação (pi) os zigotos foram separados em 2 grupos. No primeiro grupo (T1) os zigotos foram lavados e transferidos para o meio de cultivo SOFaaci e cultivados por 7 dias em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> em ar, a 39°C. No outro grupo (T2), os zigotos foram desnudados por pipetagens sucessivas, e transferidos para o meio SOFaaci, onde foram cultivados em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub>, a 39°C. As taxas de clivagem foram avaliadas 48 horas pi e as de blastocisto em D6 e D7 pi. De ambos os grupos, um total de 94 embriões no estágio de blastocisto expandido em D7 foram fixados e corados com aceto-orceína para contagem do número de células. Sete pools de 15 embriões de cada tratamento, foram congelados para avaliação da expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo, sendo superóxido dismutase (Mn-SOD), catalase e glutathiona peroxidase (GPX). Os dados relativos à taxa de clivagem e blastocisto foram analisados pelo teste do Chi-quadrado, os de número de células pela análise de variância e os relativos à expressão gênica, pelo teste *t* de Student ou teste de Mann-Whitney. A taxa de clivagem foi semelhante (P>0,05) para os grupos sendo 77,4% para o T1 e 79,9% para o T2. A taxa de blastocisto em D6 foi maior (P<0,05) no grupo cultivado em baixa tensão de O<sub>2</sub>

(40,7%) do que no de alta tensão (33,8%). Entretanto, a taxa de blastocisto em D7 foi similar ( $P>0,05$ ) para os dois grupos, sendo 44,7% e 47,1% para T1 e T2, respectivamente. O número total de células (T1=  $175,6\pm 54,1$ ; T2=  $160,6\pm 41,8$ ) dos embriões, não variou ( $P>0,05$ ) entre os dois sistemas de cultivo. A quantidade relativa de transcritos para o gene Mn-SOD foi maior ( $P<0,05$ ) na presença de alta tensão de  $O_2$ . Para a catalase e a GPX o nível de expressão foi semelhante nos dois sistemas de cultivo. Esses resultados sugerem que o cultivo de embriões bovinos em meio SOFaaci sob alta tensão de  $O_2$  na presença de células do *cumulus* não afeta a quantidade e qualidade dos embriões produzidos *in vitro*. É possível que as células do *cumulus* tenham um papel importante na retirada de substâncias indesejáveis minimizando o estresse oxidativo causado pela alta tensão de  $O_2$ .

Palavras-chave: Bovino, Embriões, Tensão de oxigênio e Estresse oxidativo.

# OXIGEN TENSION DURING IN VITRO CULTURE OF BOVINE EMBRYOS: EFFECT IN PRODUCTION AND EXPRESSION OF GENES RELATED TO OXIDATIVE STRESS

## ABSTRACT

Although substantial progress has been made in the procedures for *in vitro* maturation, fertilization and culture of bovine oocytes, the percentage and quality of embryos produced *in vitro* are lower than those produced *in vivo*. The environment where embryos are cultured after fertilization is very important factor responsible for their quality. Among the factors that can influence the culture environment, oxidative stress caused by high O<sub>2</sub> tension, has received special attention. Currently, the majority of the *in vitro* culture systems for embryo production (IVP) use SOFaaci medium under 5% of O<sub>2</sub>. Therefore, the present study had the objective to compare *in vitro* embryo production using high and low O<sub>2</sub> tension during embryo culture. A total of 1118 oocytes obtained from abattoir ovaries were matured and fertilized *in vitro*. Twenty hours pos-insemination (hpi) the zygotes were divided into two groups. In the first group (T1) the zygotes were washed and transferred to SOFaaci medium and cultured for 7 days under 5% CO<sub>2</sub> in air, at 39°C. In the second group (T2) the zygotes were denuded by successive pipetting and then, transferred to SOFaaci medium and cultured under 5% CO<sub>2</sub> and 5% de O<sub>2</sub> at 39°C. Cleavage rates were evaluated 48 hpi and the blastocyst rates at D6 and D7 pi. From both groups a total of 94 expanded blastocyst, from D7 of culture, were fixed and stained with aceto-orcein to evaluate cell numbers. Seven pools of 15 embryos from each treatment were frozen for gene expression evaluation. The abundance of transcripts for genes related to oxidative stress, superoxide dismutase (Mn-SOD), catalase and glutathione peroxidase (GPX) were determined using a semi-quantitative PCR. Data for cleavage and blastocyst rates were analyzed by Chi-square test and those for embryo cell number by analysis of variance. Data from gene expression were analyzed by *t* test or Mann-Whitney test. Cleavage rate was similar ( $P>0.05$ ) for both groups, being 77.4 % for T1 and 79.9% for T2. The blastocyst rate at D6 pi was higher ( $P<0.05$ ) in the group cultured under low O<sub>2</sub> tension (40.7%) than in the high

O<sub>2</sub> tension (33.8%). However, blastocyst rate at D7 was similar ( $P>0.05$ ) for both groups, being 44.7% and 47.1% for T1 and T2, respectively. Embryos total cell numbers (T1=175.6±54.1; T2=160.6±41.8) did not differ between culture systems ( $P>0.05$ ). The relative abundance of transcripts for Mn-SOD gene was higher ( $P<0.05$ ) for embryos cultured in high O<sub>2</sub> tension. The catalase and GPX expression level was similar for both systems. The results suggested that culture of bovine embryos in SOFaaci medium under high O<sub>2</sub> tension, in the presence of *cumulus* cells, does not affect quantity and quality of IVP embryos. It is possible that the *cumulus* cells have an important role in the removal of detrimental substances, minimizing the oxidative stress caused by the high O<sub>2</sub> concentration.

Key words: Bovine, Embryos, Oxygen tension, Oxidative stress.

## INTRODUÇÃO

O uso da reprodução assistida é hoje uma prática comum na produção animal, e visa aumentar e acelerar a multiplicação de animais de mérito genético superior que expressam características econômicas importantes.

A primeira técnica de reprodução assistida utilizada em bovinos foi a inseminação artificial (IA) na década de 40. Desde então, várias outras técnicas foram desenvolvidas visando a melhor exploração de características genéticas das fêmeas.

Com o nascimento do primeiro bezerro oriundo da fecundação *in vitro*, em 1981 (Brackett et al., 1982) a possibilidade de melhor utilização de fêmeas superiores se tornou concreta. A partir de então, a eficiência dessa técnica tem aumentado substancialmente, e está sendo utilizada em grande escala para produção de embriões de fêmeas de várias idades e em vários estados fisiológicos, tanto na pesquisa quanto comercialmente. O interesse crescente da produção *in vitro* de embriões é devido a possibilidade de aumentar rapidamente a produção de uma fêmea, visto que o número de produtos obtidos supera ao de transferência de embriões convencional. Além disso, essa técnica é uma ferramenta essencial para o estudo de várias outras biotécnicas como a clonagem e a injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI).

Entretanto, a utilização da produção *in vitro* (PIV) de embriões para aumentar a produtividade tem sido limitada pelo seu alto custo, que por sua vez é devido, principalmente, às baixas taxas de blastocisto obtidas. Existem inúmeras evidências de que os embriões produzidos *in vitro* são inferiores qualitativamente aos produzidos *in vivo* (Takahashi et al., 2000, Khurana e Niemann, 2000, Lonergan et al., 2003). Várias diferenças entre as duas categorias de embrião tem sido descritas tais como menor quantidade de células, maior quantidade de lipídios, alterações no DNA, menor criotolerância e menor taxa de prenhez (Rizos et al., 2002b).



Apesar de todo o avanço alcançado desde os primeiros estudos, os resultados da produção de embriões são baixos e tem se mantido em torno de 40% (Pereira et al., 2003). Sabe-se que a qualidade do ovócito é um fator fundamental para determinar a proporção de ovócitos imaturos que chegam a blastocisto, mas por outro lado, o ambiente de cultivo após a fecundação também pode ter um efeito drástico no desenvolvimento e na qualidade do embrião. Portanto, melhorar as condições de cultivo pela identificação de fatores, substâncias e mecanismos envolvidos no desenvolvimento embrionário é fundamental para aproximar a eficiência desse processo àquela obtida na produção *in vivo*.

Vários fatores podem influenciar o ambiente de cultivo, tais como: composição do meio, presença de soro fetal, a quantidade de embriões cultivados por volume de meio e a atmosfera gasosa (Khurana e Niemann, 2000). Dentre esses fatores o estresse oxidativo causado pela alta tensão de oxigênio utilizada durante o cultivo tem recebido especial atenção nos últimos anos (Ali et al., 2003, Bedaiwy et al., 2004, Fatehi et al., 2005).

Uma das grandes diferenças entre o ambiente *in vivo* e o *in vitro* é a tensão de oxigênio, visto que a tensão de oxigênio no oviduto e no útero é menor do que a utilizada nos sistemas de cultivo embrionário *in vitro* (Van Soom et al., 2002). Tem sido demonstrado que a diminuição na tensão de oxigênio de 20% para 5% aumenta a taxa de desenvolvimento embrionário *in vitro* em várias espécies. (Takahashi et al., 2000; Guérin et al., 2001; Yuan et al., 2003; Kitagawa et al., 2004). Esses resultados indicam que a alta tensão de oxigênio durante o cultivo afetam o desenvolvimento, provavelmente, devido ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) no citoplasma dos embriões.

Atualmente a maioria dos sistemas de cultivo para embriões bovinos produzidos *in vitro* utiliza o meio SOFaaci em atmosfera com baixa tensão de oxigênio (Lonergan et al., 1999; Hashimoto et al., 2000, Van Soom et al., 2002, Ali et al., 2003; Luciano et al., 2005). Esse sistema elimina a necessidade de co-cultivo com células somáticas, mas por outro lado, eleva o custo de produção e aumenta a manipulação pós-fecundação. Isto porque, para que se possa manter a atmosfera de 5% de oxigênio, é necessária a utilização de 5% de CO<sub>2</sub>, normalmente utilizado, e de

90% de nitrogênio. Sendo assim, nesse sistema é necessário retirar as células do *cumulus* após a fecundação, submetendo os zigotos a um estresse que pode afetar a sua capacidade de desenvolvimento.

Resultados em nosso laboratório têm demonstrado que o meio SOFaaci pode ser utilizado em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> em ar (alta tensão de oxigênio) com altas taxas de produção de blastocisto e sem a necessidade da retirada de células após a fecundação (Pereira et al., 2005). Acredita-se que as células do *cumulus* que permanecem com o zigoto e que são mantidas durante todo o cultivo funcionem como um “varredor” retirando substâncias tóxicas do meio de cultivo (Fujitani et al., 1997). Dessa forma, o estresse oxidativo causado pela alta tensão de oxigênio seria minimizado pela presença dessas células, de forma que a produção e a qualidade dos embriões produzidos seriam similares em ambos os sistemas de cultivo.

Portanto, o presente estudo teve por objetivo comparar dois sistemas de cultivo, um com alta tensão de oxigênio (O<sub>2</sub>) e outro com baixa tensão de O<sub>2</sub>, avaliando a quantidade e qualidade dos embriões PIV.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta e seleção de ovócitos**

Ovários de vacas mestiças foram coletados em um abatedouro da região do entorno de Brasília/DF. Logo após a coleta, foram transportados em solução fisiológica 0,9% à uma temperatura de 35°C. No laboratório, com o auxílio de escalpes de 18 G acoplados a uma bomba de vácuo, os folículos entre 2 e 8 mm foram aspirados. O líquido aspirado foi depositado em tubos de 15 ml (TPP®), mantidos em banho-maria à temperatura de 35°C, onde permaneceram por aproximadamente 10 minutos para a sedimentação. O pellet foi colocado em uma placa de 100 mm (TPP®) contendo meio de lavagem, composto por TCM 199 com HEPES e sais de Hank's (Invitrogen/Gibco®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Invitrogen/Gibco®), 10 UI/ml de penicilina (Sigma®) e 50 µg/ml de estreptomicina (Sigma®). A procura e seleção dos complexos *cumulus* ovócitos (CCOs) foi realizada com o auxílio de um estereomicroscópio (ZEISS® - Stemi SV6), somente os CCOs de qualidade I e II foram selecionados para o experimento. O período de tempo entre a aspiração dos folículos até os ovócitos serem colocados na maturação não foi superior à uma hora.

### **Maturação *in vitro* de ovócitos (MIV)**

Todos os meios utilizados no experimento, da maturação ao cultivo, foram fornecidos pela Nutricell ® Nutrientes Celulares Ltda (Campinas, São Paulo, Brasil).

Os CCOs selecionados foram lavados e transferidos para uma placa de 35 mm contendo 2 ml de meio de maturação *in vitro* (MIV) cobertos com 2 ml de óleo de silicone, previamente estabilizado por duas horas em incubadora à 39°C e 5% de CO<sub>2</sub> em ar, onde permaneceram por 22 horas. A composição de meio MIV consistia de TCM 199 com sais de Earl's suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB),

hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulate (FSH), L-glutamina, penicilina e estreptomicina.

### **Fecundação *in vitro* (FIV)**

Para a fecundação, os CCOs foram separados em grupos de no máximo 35 estruturas, lavados e colocados em gotas de 200  $\mu$ l de meio de fecundação (FIV), cobertas com óleo de silicone, previamente estabilizados em incubadora à 39°C e 5% de CO<sub>2</sub> em ar. O meio de fecundação utilizado foi suplementado com penicilamina, hipotaurina, e epinefrina (PHE) e heparina.

Em todo o experimento foi utilizado sêmen de um mesmo touro e de mesma partida, previamente testado para FIV. O processo de seleção espermática foi realizado pelo método do gradiente percoll (Parrish et al., 1995). O gradiente percoll consistiu de 2 ml de percoll 90% e 2 ml de percoll 45% (percoll 90% diluído com 50% meio de capacitação). O sêmen foi descongelado em banho-maria à 35°C e depositado cuidadosamente na superfície do gradiente, previamente estabilizado à 39°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, foi centrifugado a 700 G por 20 minutos à uma temperatura de 30°C, posteriormente o “pellet” foi retirado e lavado em 1 ml de meio de capacitação, sendo novamente centrifugado por 5 minutos. O “pellet” resultante foi ressuspensionado com meio de fecundação. A concentração final do sêmen na gota de FIV foi de  $1 \times 10^6$  espermatozóides/ml.

Espermatozóides e CCOs foram co-incubados por 20-22 horas à 39°C e 5% de CO<sub>2</sub> em ar, sendo o dia da inseminação considerado D0.

## **Cultivo *in vitro* de embriões**

Após o período de fecundação, os prováveis zigotos foram divididos em dois grupos, descritos a seguir:

-Alta tensão de O<sub>2</sub> : os zigotos foram retirados da gota de fecundação e colocados em gotas de PBS sem cálcio e sem magnésio, suplementado com 0,03% de albumina sérica bovina (BSA - Sigma®), onde permaneceram sobre uma placa aquecedora à 36°C, enquanto o outro grupo foi preparado. Em seguida, os zigotos, em grupos de no máximo 35, foram lavados e transferidos para o meio de cultivo, em gotas de 200 µl cobertas com óleo de silicone.

-Baixa tensão de O<sub>2</sub> : os prováveis zigotos foram transferidos para um microtubo contendo 100 µl de PBS sem cálcio e sem magnésio, suplementado com 0,03% de BSA aquecido e em seguida levado à incubadora, permanecendo fechado, por aproximadamente 10 minutos. Posteriormente, com o auxílio de um pipetador graduado para 75 µl, foram efetuadas 60 pipetagens ininterruptas para desnudar os zigotos. No caso de persistência de muitas células, foi efetuada outra sessão de pipetagens, e em seguida os zigotos foram lavados e transferidos para gotas de 200 µl de meio de cultivo cobertas com óleo de silicone e previamente estabilizadas à 39°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90 % de nitrogênio.

Durante a retirada das células do *cumulus*, ambos os grupos permaneceram o mesmo tempo em PBS suplementado com 0,03% de BSA.

Para o cultivo, o meio utilizado foi o SOFaaci, suplementado com aminoácidos essenciais, tri-citrato de sódio, myo-inositol e 5% de SFB.

Foram avaliadas taxa de clivagem em D2 e de blastocisto em D6 e D7. No sétimo dia de cultivo foram retirados de ambos os grupos, os embriões no estágio de blastocisto expandido (Bx) do mesmo tamanho e com qualidade semelhante, lavados em PBS sem SFB ou BSA e congelados em pools de 15 para avaliação de expressão gênica, ou fixados para contagem de células.

## **Avaliação do número total de células dos embriões**

A determinação do número total de células dos embriões no estágio de Bx em D7, foi realizado utilizando a técnica descrita por Vajta et al. (2000). Foram contadas células de 44 embriões de T1 e 50 embriões de T2.

Inicialmente os embriões foram colocados em uma solução de citrato de sódio (Sigma®) 0,9% por 5-10 minutos e depois passados rapidamente na solução de fixação (entre 10 a 20 segundos) para ruptura da zona pelúcida e então transferidos para uma lâmina. A solução fixadora consistia de 600 µl de etanol (Merck®) 96%, 400 µl de ácido acético (Merck®) e 200 µl de água destilada.

Após a secagem das lâminas em temperatura ambiente, as mesmas permaneceram mergulhadas em solução 3:1 de etanol absoluto (Merck®) e ácido acético (Merck®), por no mínimo 12 horas.

Para a contagem do número total de células, as lâminas foram retiradas do fixador e colocadas para secar em temperatura ambiente. Em seguida, foram coradas com uma solução a 2% de orceína acética por 10 minutos. O corante foi removido com água destilada e as lâminas foram colocadas para secar em temperatura ambiente. Os núcleos foram contados com o auxílio de um microscópio (Nikon®) de campo claro, em objetiva de 20X.

## **Avaliação da expressão gênica**

Para a avaliação da expressão gênica nos embriões foi utilizada a técnica de RT-PCR semi-quantitativo, sendo avaliados 3 genes envolvidos com estresse oxidativo, Catalase, Glutaciona Peroxidase (GPX) e Superóxido Dismutase (Mn-SOD) e um gene relacionado com o reconhecimento materno fetal da prenhez

(Interferon- $\tau$ ). Foi utilizado como controle, o gene constitutivo GAPDH. As seqüências dos *primers* são apresentadas na tabela 1.

**Tabela 1.** Sequência dos *primers* utilizados no experimento

Gene		Primer	Fragmento
Catalase	sense	5'-GTTTCGCTTCTCCACTGTT-3'	454 pb
	antisense	5'-GGCCATAGTCAGGATCTT-3'	
Mn-SOD	sense	5'-CCCATGAAGCCTTTCTAATCCTG-3'	307 pb
	antisense	5'-TTCAGAGGCGCTACTATTTTCCTTC-3'	
Interferon- $\tau$	sense	5'-GCCCTGGTGCTGGTCAGCTA-3'	564 pb
	antisense	5'-CATCTTAGTCAGCGAGAGTC-3'	
GPX	sense	5'-CGCCGAGTGTGGTTTAC-3'	315 pb
	antisense	5'-AGGTCCTTCTCTATCACCAG-3'	
GAPDH	sense	5'-CCCATCACCATCTTCCAGG-3'	471 pb
	antisense	5'-AGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3'	

Mn-SOD = Mn-superóxido dismutase; GPX = glutationa peroxidase;

Foram utilizados 7 *pools* por tratamento, com 15 embriões cada, de manipulações diferentes, que foram coletados e congelados em quantidade mínima de PBS à temperatura de - 80°C.

Para a extração do RNA total foi utilizado *Trizol Reagent* (Invitrogen™) seguindo as recomendações do fabricante, mas com modificações. O material foi descongelado à temperatura ambiente por 5 minutos; em seguida foi adicionado 100  $\mu$ L de Trizol e 25  $\mu$ g de glicogênio e levado ao vórtex a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, foi adicionado 20  $\mu$ L de clorofórmio e voltou ao vórtex por 15 segundos sendo deixado em repouso por 2 minutos à temperatura ambiente. Após o repouso, o tubo contendo o material foi centrifugado a 12000g por 15 minutos à 4°C sendo retirado o sobrenadante e transferido para outro tubo. Nesse tubo foi então adicionado 50  $\mu$ L de isopropanol gelado para precipitar o RNA, sendo deixado por 2 horas à - 20°C. Após esse período, o material foi retirado do *freezer* e

centrifugado a 13000g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 100 µL de etanol 75%, centrifugando a 7000g por mais 7 minutos à 4°C. Após estes procedimentos, o tubo foi deixado aberto em temperatura ambiente para secagem do *pellet* por 10 minutos. Logo, o “pellet” em seguida foi ressuspensionado com 10 µL de água milli-Q, ficando o tubo em banho-maria à 55° por 10 minutos para diluir o *pellet*, antes do tratamento com DNase.

Para o tratamento com DNase o tubo foi centrifugado a 5000g por 10 segundos e foi retirado 9 µL sendo colocados em outro tubo de 0,2 mL, onde foi adicionado o tampão da DNase para uma concentração final de 1X. Em seguida, 0,5µL de DNase de concentração 1U/µL, foram adicionadas; o tubo ficou em banho-maria à 37°C por 30 minutos. Em seguida foi colocado no gelo novamente, e posteriormente adicionou-se 1 µL de *stop solution* (para parar a reação da enzima) e novamente foi levado ao banho-maria à 65°C por mais 10 minutos.

A síntese de cDNA foi realizada em um tubo de 0,2 mL, sendo utilizados 10 µL de RNA total, 0,5µg de oligo(dT) e 200µM dos 4 dNTP's. O tubo foi mantido à 65°C por 5 minutos. Resfriou-se por 1 minuto, adicionou-se tampão (1X) da enzima transcriptase reversa (RT), 2µL de DTT (0,1M) e 40U de RNase OUT. Em seguida, a reação foi submetida à 42°C por 52 minutos, sendo que aos dois minutos, o programa foi parado e adicionado ao tubo 200 U da enzima RT e foi dado segmento ao programa, terminando com um passo a 70°C por 15 minutos.

Para a PCR, as condições de reação foram as seguintes: 1 µL de cDNA, 2U de Taq DNA polimerase, 10 pmoles de cada *primer*, 0,8 mM dos 4 dNTP's, 2 mM de MgCl<sub>2</sub> e tampão da enzima 1X. O programa para a amplificação foi: desnaturação inicial à 93°C por 5 minutos, seguida de 29 ciclos para os genes GPX, Mn-SOD e interferon-τ, 31 ciclos para o gene GAPDH, e 33 ciclos para o gene catalase, à 93°C por 40 segundos, 54°C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto, terminando com uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio.



## **Delineamento experimental**

### **Experimento 1: Produção *in vitro* de embriões em dois sistemas de cultivo.**

No presente experimento foram avaliados os efeitos dos ambientes de cultivo, sob alta e baixa tensão de  $O_2$ , na produção de embriões. Um total de 1118 CCOs foram maturados e fecundados *in vitro*. Após a fecundação, os prováveis zigotos foram divididos aleatoriamente nos dois tratamentos: sob alta (20%) e baixa (5%) tensão de  $O_2$ . A taxa de clivagem foi avaliada em D2 pi e os blastocistos em D6 e D7 pi.

### **Experimento 2: Avaliação do número total de células dos embriões produzidos em dois sistemas de cultivo.**

No presente experimento foi avaliado o número total de células dos embriões produzidos em diferentes sistemas de cultivo, com alta (20%) e baixa (5%) tensão de  $O_2$ . Para isso, foram utilizados 94 embriões (44 de T1 e 50 de T2) no estágio de Bx em D7, e de mesma qualidade, fixados em lâmina e corados com orceína acética a 2%, para contagem dos núcleos.

### **Experimento 3: Avaliação da expressão gênica**

O objetivo deste experimento foi avaliar a expressão dos genes Glutathione Peroxidase (GPX), Catalase, Superóxido Dismutase (MnSOD) e Interferon- $\tau$  nos embriões produzidos em dois diferentes sistemas de cultivo, um com alta (20%) e outro com baixa (5%) tensão de  $O_2$ . Foram utilizados sete *pools* de 15 embriões cada um, de réplicas diferentes, para cada tratamento.

A extração do RNA total foi feita através da técnica do Trizol Reagent® com modificações. Para avaliação da expressão gênica foi utilizada a técnica de RT-PCR-semiquantitativo, sendo a quantidade relativa de transcritos determinada por densitometria pelo programa Image J, versão 1.36b, utilizando o gene constitutivo GAPDH como referência.

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados relativos à taxa de clivagem e produção de blastocistos foram analisados pelo teste Chi-quadrado ( $\chi^2$ ) e os dados de avaliação do número total de células dos embriões, pelo teste de análise de variância.

Os dados da expressão gênica foram comparados pelo teste *t* de *Student* ou teste de Mann-Whitney, utilizando o programa Prophet, versão 5.0, 1996.

O nível de significância considerado foi  $P < 0.05$ .

## RESULTADOS

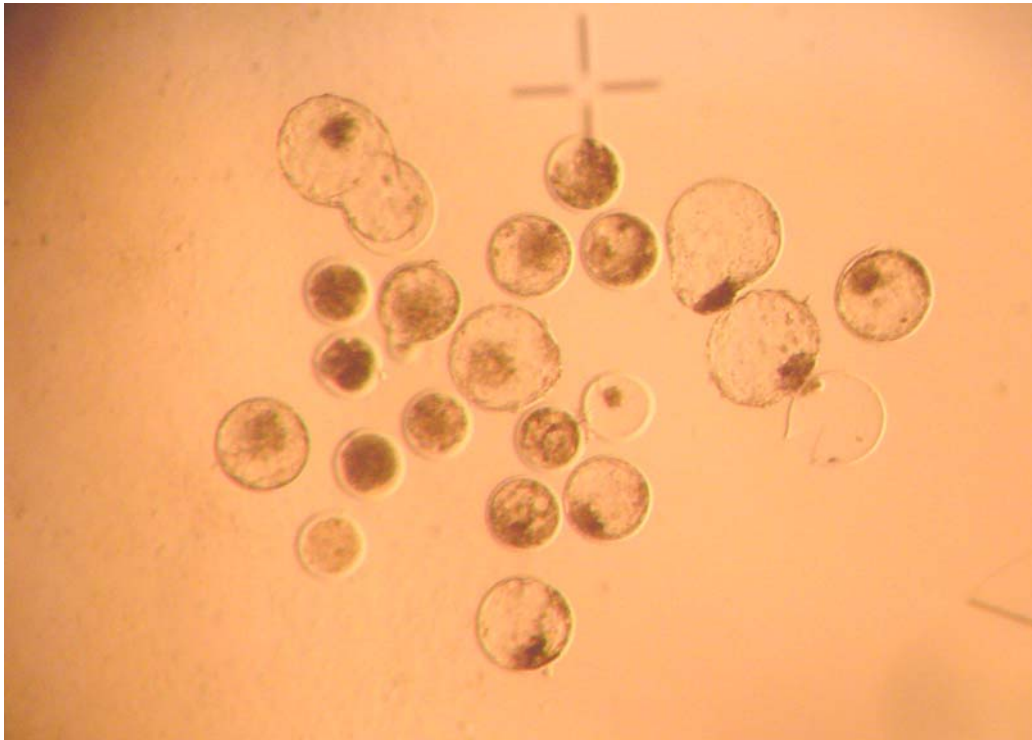
No experimento 1 foi avaliado o efeito do sistema de cultivo embrionário, utilizando alta (T1) e baixa (T2) tensão de O<sub>2</sub> na produção *in vitro* de embriões bovinos. A taxa de clivagem e produção de blastocistos em D7 foi semelhante (P>0.05) para os dois tratamentos (Tabela 2). Entretanto, o cultivo em baixa tensão de O<sub>2</sub> teve um efeito estimulatório na velocidade de desenvolvimento, visto que esse grupo apresentou maior (P<0.05) percentagem de blastocisto em D6 do que o cultivado em baixa tensão (Figuras 1 e 2).

**Tabela 2.** Produção *in vitro* de embriões bovinos cultivados sob alta (T1) e baixa (T2) tensão de O<sub>2</sub>.

Tratamento	Ovócitos(n)	Clivagem(%)	Blastocisto (%)	
			D6	D7
T1	570	441 (77,4) <sup>a</sup>	125 (21,9) <sup>a</sup>	254 (44,5) <sup>a</sup>
T2	548	438 (79,9) <sup>a</sup>	205 (37,4) <sup>b</sup>	258 (47,1) <sup>a</sup>

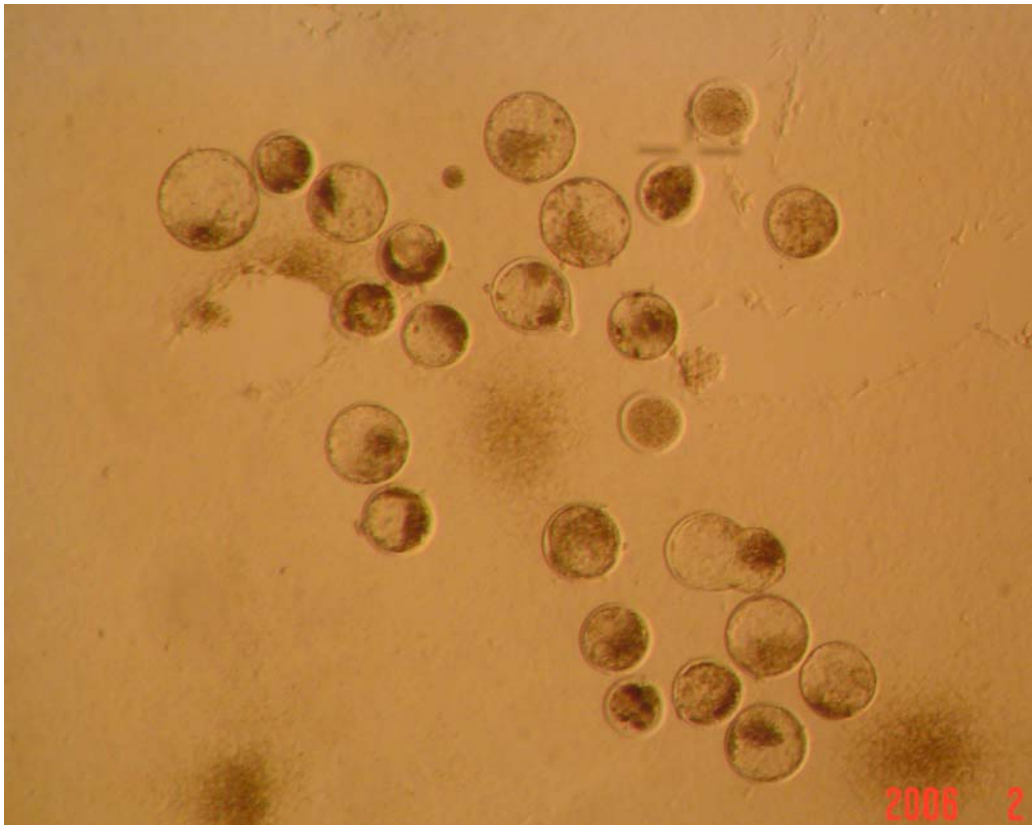
<sup>a,b</sup> Diferentes subscritos na coluna diferem significativamente (P< 0.05).

**Figura 1:** Embriões D7 produzidos em sistema com baixa tensão de O<sub>2</sub>.



Aumento de 160 vezes.

**Figura 2:** Embriões D7 produzidos em sistema com alta tensão de O<sub>2</sub>.



Aumento de 160 vezes.

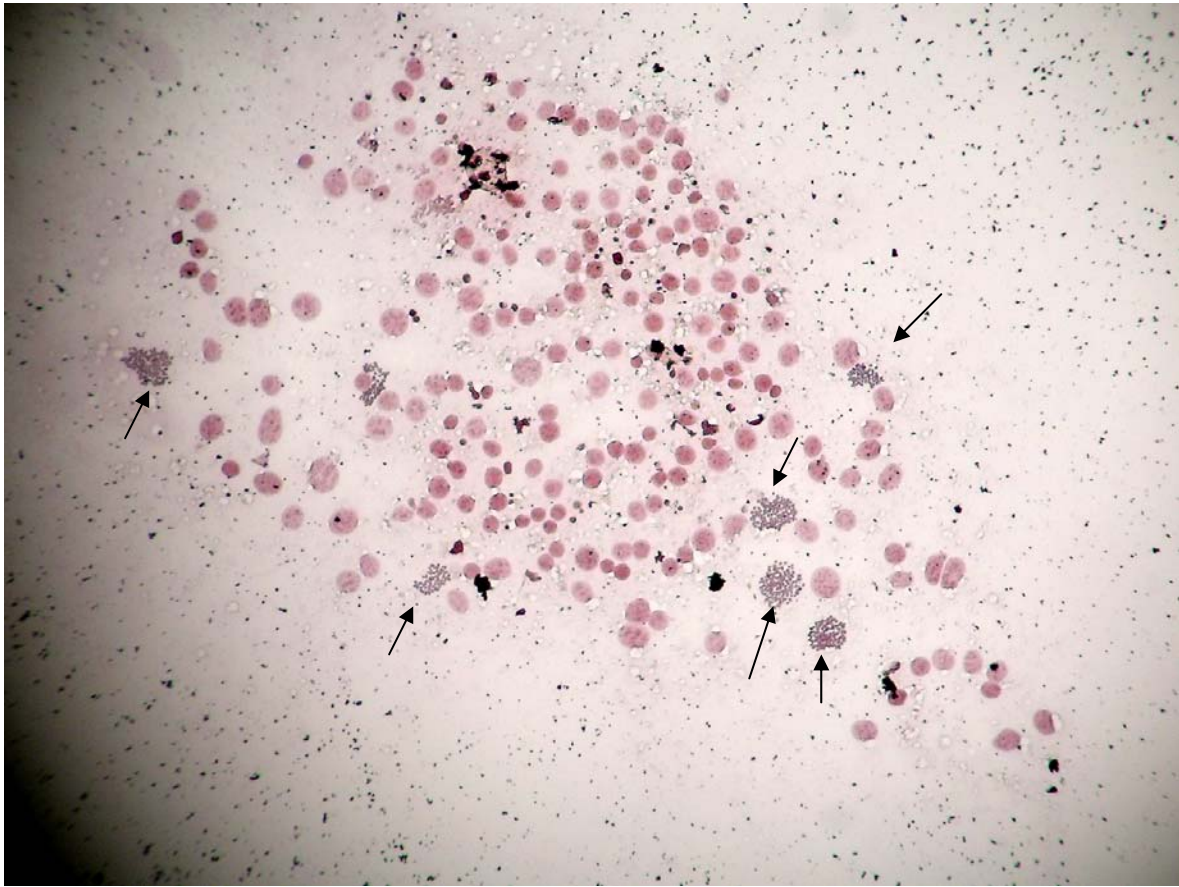
Para a avaliação da qualidade dos embriões produzidos em diferentes sistemas de cultivo, no experimento 2 os embriões em estágio de blastocisto (em D7) foram fixados e corados para determinação do número de células. A média do número de células por embrião foi similar ( $P>0.05$ ) nos dois tratamentos (Tabela 3). Resultados semelhantes foram observados para o número de células que se encontravam em divisão celular (metáfase), no momento da fixação dos embriões (Figura 3).

**Tabela 3.** Avaliação do número total de células dos embriões produzidos sob diferentes tensões de oxigênio, 20% (T1) e 5% (T2).

Tratamento	Embriões (n)	N° Células (média±dp)	N° Células em Metáfase (média±dp)
T1	44	175,57 ± 54,13 <sup>a</sup>	5,89 ± 3,08 <sup>a</sup>
T2	50	160,58 ± 44,01 <sup>a</sup>	5,02 ± 2,84 <sup>a</sup>

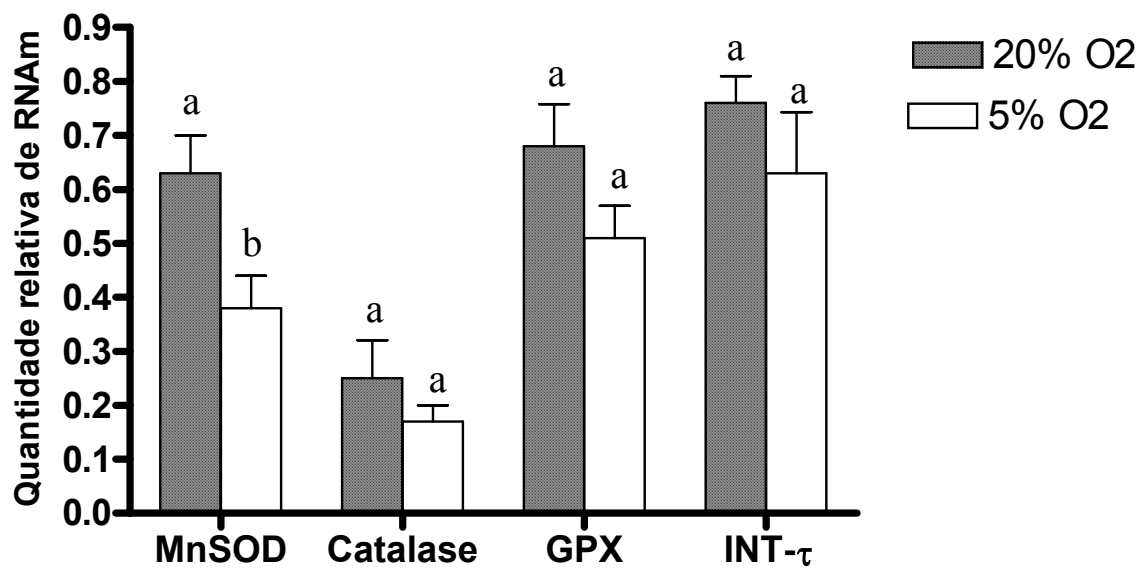
<sup>a,b</sup> Diferentes subscritos na coluna diferem significativamente ( $P < 0.05$ ).

**Figura 3:** Blastocisto expandido em D7 corado com orceína-acética para contagem do número total de células.



As setas representam células em metáfase.

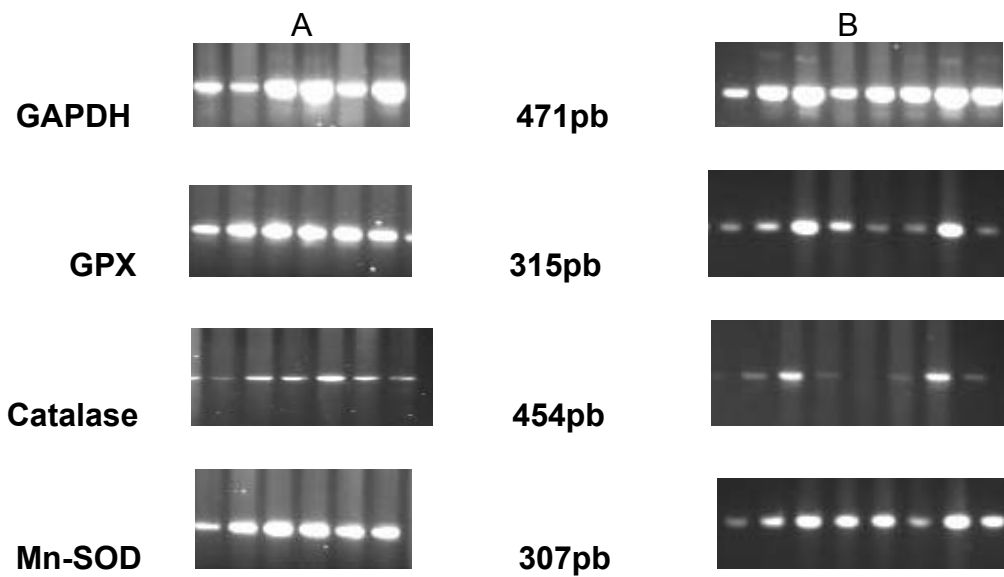
Com relação ao experimento 3, o cultivo na presença de alta tensão de  $O_2$  resultou em um aumento ( $P < 0.05$ ) na quantidade relativa de transcritos para o gene da Mn-SOD. Apesar da expressão do gene GPX ter sido semelhante ( $P > 0.05$ ) para os dois grupos, uma tendência a ser mais expresso nos embriões cultivados em alta tensão do que em baixa tensão ( $P = 0,0973$ ), foi observada. Com relação aos genes da Catalase e o Interferon- $\tau$ , o nível de expressão foi semelhante ( $P > 0.05$ ) nos dois sistemas de cultivo (Figura 4). Os produtos amplificados para os genes avaliados são mostrados na figura 5.



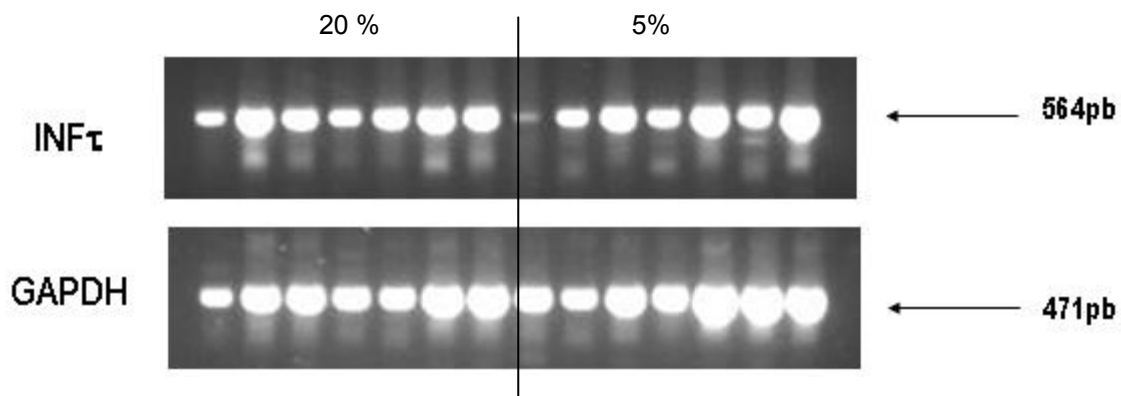
**Figura 4.** Quantidade relativa de mRNA dos genes Manganês Superóxido Dismutase (Mn-SOD), Catalase e Glutaciona Peroxidase (GPX4) em embriões no estágio de Bx em D7, cultivados em sistemas com alta (20%) e baixa (5%) tensão de O<sub>2</sub>.

<sup>a,b</sup> Diferentes subscritos diferem significativamente (P<0.05).





**Figura 5:** Eletroforese em gel de agarose representando os amplicons para os genes GAPDH, GPX, catalase e Mn-SOD. Em todas as fotos da figura A, as três primeiras linhas representam T1 (20% de O<sub>2</sub>) e as três últimas T2 (5% de O<sub>2</sub>) e na figura B, as quatro três primeiras linhas representam T1 (20% de O<sub>2</sub>) e as quatro últimas T2 (5% de O<sub>2</sub>).



**Figura 6:** Eletroforese em gel de agarose representando os amplicons para os genes Interferon- $\tau$  e GAPDH.

## DISCUSSÃO

O estresse oxidativo tem sido apontado como um dos responsáveis pela baixa qualidade e produção de embriões *in vitro*. Sendo que vários estudos têm demonstrado que diminuindo a tensão de oxigênio durante o cultivo embrionário, aumenta a produção e qualidade dos embriões.

Um aumento de peróxidos foi observado em embriões de camundongos cultivados *in vitro* (Goto et al., 1993), sugerindo que durante o cultivo ocorre um desequilíbrio entre a produção e a degradação de ROS. Fatores ambientais como exposição à luz e alta tensão de O<sub>2</sub> resultam em alterações no metabolismo dos embriões e aumento na produção intracelular de ROS. Portanto, as ROS podem interferir no estado redox do embrião causando o estresse oxidativo, que pode alterar funções celulares importantes, como o controle da expressão gênica (Mouatassim et al., 1999).

Atualmente, a maioria dos laboratórios utiliza como sistema de cultivo de embriões produzidos *in vitro*, o meio SOF em atmosfera de 5% O<sub>2</sub> e na ausência de co-cultivo com células somáticas. Entretanto, levantamos a hipótese de que os efeitos da alta tensão de O<sub>2</sub> na produção de embriões bovinos, podem ser amenizados se o cultivo for realizado na presença de células somáticas. Para testar essa hipótese, foram avaliados dois sistemas de cultivo, sendo um com alta tensão de O<sub>2</sub> e presença de co-cultivo e outro com baixa tensão de O<sub>2</sub> e ausência de co-cultivo no ambiente de cultivo embrionário pós-fecundação. Os resultados mostraram que, apesar da produção de blastocistos em D6 ter sido maior no grupo cultivado sob 5% de O<sub>2</sub>, não houve diferença no desenvolvimento ao estágio de blastocisto em D7 para os dois sistemas. Resultados semelhantes foram encontrados por Khurana e Niemann (2000) e Both et al. (2005), que obtiveram taxas semelhantes de blastocisto em D7, quando o cultivo foi realizado sob 5% e 20% de O<sub>2</sub>. Entretanto, a maioria dos trabalhos relatam os efeitos prejudiciais da alta concentração de O<sub>2</sub> durante o cultivo, obtendo maior produção de embriões quando o cultivo é realizado com 5% de O<sub>2</sub> (Takahashi et al., 2000 e Yuan et al., 2003; Kitagawa et al., 2004; Petersen et al., 2005). Isso pode ser devido, principalmente,

ao estresse oxidativo causado pela alta tensão de O<sub>2</sub>, aumentando a produção de ROS pelos embriões, e conseqüentemente prejudicando a formação e qualidade desses embriões (Takahashi et al., 2000). Essa hipótese pode ser explicada pelo fato de que no oviduto e no útero de fêmeas mamíferas, a concentração de O<sub>2</sub> é menor do que no ambiente comumente utilizado para o cultivo *in vitro* (Van Soom et al., 2002).

Vários parâmetros podem ser utilizados para avaliar a qualidade de um embrião, como a fragmentação de DNA (Takahashi et al., 2000; Karja et al., 2004), menor número de células apoptóticas (Yuan et al., 2003), maior taxa de sobrevivência pós descongelamento (Petersen et al., 2005), menor produção de ROS (Kitagawa et al., 2004) e número total de células (Lonergan et al., 1999; Booth et al., 2005), entre outros parâmetros. No presente estudo, o número total de células foi um dos parâmetros utilizados para essa avaliação. Em ambos os tratamentos, ou seja, tanto com alta como com baixa tensão de O<sub>2</sub>, o número total de células dos embriões avaliados foi semelhante ( $P > 0.05$ ). Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Khurana e Niemann (2000), entretanto diferem dos relatados por Lonergan et al. (1999) e Booth et al. (2005), que obtiveram maior número total de células para embriões produzidos sob atmosfera de 5% de O<sub>2</sub>.

Considerando que as taxas de clivagem e blastocisto em D7, assim como o número total de células, foram semelhantes para os dois sistemas, pode-se sugerir que as células do *cumulus*, utilizadas para o co-cultivo, também foram responsáveis pelos resultados obtidos, assim como a expressão da Mn-SOD pelos próprios embriões, que aumentou seus níveis para se defender do estresse causado pela alta tensão de O<sub>2</sub>. O efeito benéfico das células do *cumulus* se deve a capacidade que possuem de eliminar substâncias embriotóxicas do meio de cultivo, como por exemplo, as ROS, fazendo uma varredura e limpando a ambiente em que os embriões estão se desenvolvendo, além de secretar substâncias benéficas aos mesmos (Harvey et al., 1995; Bavister et al. 1992). Como fatores embriotróficos secretados pelas células somáticas em sistemas de co-cultivo, destacam-se os fatores de crescimento, e também os agentes neutralizadores de toxinas, como os antioxidantes e quelantes de metais pesados (Donnay et al., 1997). Além disso, tem sido relatado que elas são essenciais durante a produção e liberação de glutiona

(GSH), maior composto sulfidril não-proteico presente nas células de mamíferos com função de proteção contra o estresse oxidativo (Luciano et al., 2005), pois intensificam o poder estimulatório da cisteína e da cistina (precursores da GSH) na síntese da glutathione (Luberda, 2005). Portanto, o aumento no estresse oxidativo devido à alta tensão de O<sub>2</sub> foi, possivelmente, neutralizado pela presença dessas células e também pelo aumento dos níveis de expressão da Mn-SOD. Geralmente, nos experimentos que relatam maior produção de embriões sob 5% de O<sub>2</sub> (Takahashi et al., 2000; Yuan et al., 2003; Kitagawa et al., 2004), o cultivo pós-fecundação ocorre na ausência de co-cultivo, tanto sob 5% quanto sob 20% de O<sub>2</sub>. No entanto, no trabalho de Khurana e Niemann (2000), em que a produção embrionária foi semelhante para ambas as tensões de O<sub>2</sub>, foi realizado o co-cultivo com células somáticas em ambos os tratamentos, confirmando os seus efeitos benéficos já citados por outros autores (Donnay et al., 1997; Kim et al., 1999; Luciano et al., 2005).

Estudos comparando sistemas de cultivo, em geral, avaliam a porcentagem de embriões produzidos. Entretanto, outros parâmetros devem ser utilizados para um melhor entendimento dos processos estudados. Considerando que a proteção do embrião contra as ROS depende, em parte, do pool de enzimas antioxidantes (Harvey et al., 1995), e que a expressão dos genes dessas enzimas pode ser estimulada pelo estresse oxidativo, no presente trabalho foi também avaliada a expressão dos genes que codificam as enzimas Mn-SOD, GPX, catalase e interferon- $\tau$  em embriões cultivados sob alta e baixa tensão de O<sub>2</sub>.

O cultivo em alta tensão de O<sub>2</sub> resultou em um aumento significativo no nível de expressão da Mn-SOD. Nesse grupo também foi observada uma tendência em apresentar maior expressão da GPX, entretanto os níveis de expressão da catalase e do interferon- $\tau$  foram similares em ambos os sistemas.

Tem sido demonstrado que o cultivo na presença de tiols de baixo peso molecular, como a cisteamina, melhora o desenvolvimento de embriões bovinos (de Matos et al., 2002), entretanto o mesmo efeito não foi observado quando enzimas antioxidantes foram adicionadas no meio de cultivo (Ali e Sirard, 2003). É possível que os tiols sejam aproveitados pelas células embrionárias, diminuindo o nível de

ROS intracelular, enquanto as enzimas não consigam atravessar a membrana, podendo agir somente no meio de cultivo. Portanto, um aumento na expressão desses genes parece ser a resposta natural das células para se proteger contra o estresse oxidativo causado pela alta tensão de O<sub>2</sub>. Os embriões cultivados com 20%, apresentam maior quantidade relativa de transcritos para a enzima Mn-SOD, o que sugere que eles estavam submetidos a um maior estresse, e por isso ajustaram a expressão para esse gene na tentativa de compensar a condição sub-ótima de cultivo.

No sistema antioxidante, as SODs são as enzimas iniciais, que permitem a conversão dos ânions superóxido em peróxido de hidrogênio, que por sua vez serão removidos pela catalase e GPX. Lequarre et al. (2001), avaliando a influência das condições de cultivo na expressão da Mn-SOD e da Cu/Zn-SOD em embriões produzidos *in vitro*, na presença ou ausência de soro, demonstraram que, diferente da Cu/Zn-SOD, a detecção de mRNA para a Mn-SOD depende das condições de cultivo e é induzida mais cedo na presença de soro. O soro, por conter vários fatores definidos e indefinidos, pode alterar a expressão de alguns genes, como já tem sido demonstrado (Wrenzycki et al., 1999). Entretanto, no presente estudo, ambos os tratamentos foram realizados na presença de soro, sendo a tensão de O<sub>2</sub> e a presença de co-cultivo, a diferença entre eles.

Diferente da catalase, cuja função é especificamente a destruição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a GPX tem um maior espectro de ação, visto que também reduz as peroxidases lipídicas (Limaye et al., 2003). Tem sido demonstrado que a atividade da GPX, mesmo associada com a geração de glutatona reduzida, traz mais benefícios para o ovócito do que a atividade da catalase (Mouatassim et al., 1999). Apesar de ambas, a catalase e a GPX quebrarem o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzidos pela SOD, a GPX catalisa reações para muitos peróxidos, incluindo peróxidos lipídicos, promovendo, portanto, uma melhor proteção (Mouatassim et al., 1999). De fato, tem sido demonstrado que a GPX é a enzima chave no sistema antioxidante sob condições normais e condições de estresse oxidativo, e que uma menor quantidade de GPX, do que catalase ou SOD, é necessária para fornecer a mesma proteção durante o estresse oxidativo (Remacle et al., 1992). No presente estudo, o grupo com alta tensão de O<sub>2</sub>

mostrou uma tendência no aumento da expressão de GPX, o qual não deve ser ignorado.

O interferon- $\tau$  tem sido considerado um gene marcador da qualidade embrionária (Rizos et al., 2003 e Rizos et al., 2004). Wrenzychi et al. (1999) e Rizos et al. (2003) observaram maiores níveis de expressão para o interferon- $\tau$  em embriões cultivados na ausência de soro fetal. Esses embriões demonstraram maior criotolerância (Rizos et al., 2003), permitindo aos autores considerarem esses embriões de melhor qualidade que aqueles cultivados na presença de soro. Rizos et al. (2004), comparando embriões PIV bovinos e ovinos, encontraram maior nível de expressão para o interferon- $\tau$  em embriões bovinos, sugerindo que embriões ovinos possuem qualidade superior aos bovinos no sistema testado. Em nosso estudo não encontramos diferença nos níveis de expressão para esse gene, o que pode contribuir para a semelhança na qualidade entre os embriões produzidos em ambos os sistemas de cultivo.

Apesar dos tratamentos apresentarem taxas de blastocistos semelhantes, o cultivo em alta tensão de  $O_2$  resultou em um aumento significativo no nível de expressão da Mn-SOD e um discreto aumento na expressão de GPX. Esses resultados sugerem que, mesmo na presença de células do *cumulus*, o cultivo em alta tensão de  $O_2$ , provavelmente causou uma maior produção de ROS, o que causou um aumento dos transcritos para enzimas importantes na resistência ao estresse oxidativo nos embriões. Entretanto, os níveis de expressão da catalase foram similares para ambos, sugerindo que se o estresse oxidativo foi maior para um dos grupos, não foi severo o suficiente para causar uma mudança em todo o sistema antioxidante além de não comprometer os resultados, pois os níveis de interferon- $\tau$  também foram semelhantes em ambos os tratamentos.

Além disso, a maior expressão da Mn-SOD tem sido relacionada a embriões de melhor qualidade (Rizos et al., 2002a; Rizos et al., 2003; Lonergan et al., 2003; Rizos et al., 2004). O menor nível de expressão observada em embriões de qualidade inferior tem sido atribuído à menor atividade mitocondrial (Lonergan et al., 2003), provavelmente por redução na densidade total das mitocôndrias nos

embriões de pior qualidade (Crosier et al., 2001). Além disso, a maior expressão de Mn-SOD, e não de Cu/Zn-SOD, catalase ou GPX foi associada com a redução no número de células da granulosa apoptóticas e redução de folículos atréticos no ovário de camundongos, confirmando a relação entre qualidade celular e maior abundância de transcritos para essa enzima (Tilly & Tilly, 1995).

É possível que nesse estudo, a maior expressão de Mn-SOD indique que esses embriões tiveram plasticidade suficiente para se defender de um meio com maior quantidade de ROS, e que isso não comprometeu sua qualidade, o que pode ser afirmado baseado no resultado do interferon- $\tau$ . Entretanto, estudos adicionais, utilizando outras variáveis para a qualidade embrionária, ou preferencialmente, avaliando as taxas de prenhez para embriões cultivados nesses dois sistemas são necessários para confirmar essa hipótese.

Com base nos resultados, pode-se concluir que o cultivo em meio SOFaaci sob alta tensão de O<sub>2</sub>, na presença de células do *cumulus* é tão eficiente quanto o cultivo sob baixa tensão de O<sub>2</sub> na produção de embriões *in vitro*, em quantidade e qualidade, concordando com a hipótese levantada. É possível que as células do *cumulus* tenham um papel importante na retirada de substâncias indesejáveis minimizando o estresse oxidativo causado pela alta tensão de O<sub>2</sub>. Além disso, a maior expressão de genes para enzimas antioxidantes nesse grupo de embriões sugere que os mesmos possuem capacidade de adaptação às condições do ambiente.

## CONCLUSÃO

Nas condições em que foi realizado este trabalho, podemos concluir que o cultivo de embriões bovinos sob alta tensão de O<sub>2</sub> na presença de células do *cumulus* é tão eficiente quanto o cultivo sob baixa tensão de O<sub>2</sub>, na produção e qualidade dos embriões produzidos *in vitro*. Além disso, os embriões produzidos sob alta tensão de O<sub>2</sub> apresentaram uma maior expressão de genes para Mn-SOD, enzima fundamental no sistema antioxidante celular.

Entretanto, para que se possa confirmar a qualidade similar dos embriões de ambos os sistemas, é necessário avaliar a taxa de prenhez e taxa de reabsorção embrionária e fetal após a transferência dos embriões, a criotolerância desses embriões, além da presença de ROS produzidos no meio de cultivo.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, A.A.; BILODEAU, J.F.; SIRARD, M.A. Antioxidants requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. **Theriogenology**. v. 59, p. 939-949, 2003.
- BAVISTER, B.D. Co-culture for embryo development: is it really necessary? **Human Reprod.** v. 7, p. 1339-1341, 1992.
- BEDAIWY, M.A.; FALCONE, T.; MOHAMED, M.S. et al. Differential growth of human embryos *in vitro*: role of reactive oxygen species. **Fertility and Sterility**. v. 82, nº 03, p. 593-600, 2004.
- BOOTH, P.J.; HOLM, P.; CALLESEN, H. The effect of oxygen tension on porcine embryonic development is dependent on embryo type. **Theriogenology**. v. 63, p. 2040-2052, 2005.
- BOQUEST, A.C.; ABEYDEERA, L.R.; WANG, W.H.; DAY, B.N. Effect of adding reduced glutathione during insemination on the development of porcine embryos *in vitro*. **Theriogenology**. v. 51, p. 1311-1319, 1999.
- BRACKETT, B.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; et al. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biol. Reprod.** v. 27, p. 147-158, 1982.
- DONNAY, I.; VAN LANGENDONCKT, A.; AUQUIER, P.; GRISART, B.; VANSTEENBRUGGE, A.; MASSIP, A. et al. Effects of co-culture and embryo number on the *in vitro* development of bovine embryos. **Theriogenology**. v. 47, p. 1549-1561, 1997.
- CROSIER, A.E.; FARIN, P.W.; DYKSTRAM, J. et al. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. **Biol. Reprod.** v. 64, p. 1375-1385, 2001.
- FATEHI, A.N.; ROELEN, B.A.; COLENBRANDER, B.; SCHOEVERS, E.J.; GADELLA B.M.; BEVERST, M.M.; VAN DEN HURK, R. Presence of *cumulus* cells during *in vitro* fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. **Zygote**, v.13, p.177-185, 2005.
- FUJITANI, Y.; KASAI, K.; OHTANI, S. et al. Effect of oxygen concentration and free radicals on *in vitro* development of *in vitro*-produced bovine embryos. **J. Anim. Sci.** v. 75, p. 483-489, 1997.
- GOTO, K.; NODA, Y.; MORI, T. et al. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured *in vitro*. **Free Radical Biol. Med.** v. 15, p.69-75, 1993.

GUÉRIN, P.; MOUATASSIM, S. El and MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reprod. Update.** v. 07, n° 02, p. 175-189, 2001.

HARVEY, M.B.; ARCELLANA-PANLILIO, M.Y.; ZHANG, X. et al. Expression of genes encoding antioxidant enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary oviduct cultures employed for embryo coculture. **Biol. Reprod.** v. 53, p. 532-540, 1995.

HASHIMOTO, S.; MINAMI, N.; TAKAKURA, R. et al. Low oxygen tension during *in vitro* maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine *cumulus*-oocyte complexes. **Mol. Reprod. Devel.** v. 57, p. 353-360, 2000.

KARJA, N.W.K.; WONGSRIKEAO, P.; MURAKAMI, M. et al. Effects of oxygen tension on the development and quality of porcine *in vitro* fertilized embryos. **Theriogenology.** v. 62, p. 1585-1595, 2004.

KIM, I.H.; VAN LANGENDONCKT, A.; VAN SOOM, A. et al. Effect of exogenous glutathione on the *in vitro* fertilization of bovine oocytes. **Theriogenology.** v. 52, p. 537-547, 1999.

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.** v. 62, p. 1186-1197, 2004.

KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, *cumulus* cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology.** v. 54, p. 741-756, 2000.

LAPOINTE, J. and BILODEAU, J.F. Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. **Biol. Reprod.** v. 68, p. 1157-1164, 2003.

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

LIM, J.M.; ROCHA, A.; HANSEL, W. A serum-free medium for use in a *cumulus* cell co-culture system for bovine embryos derived from *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization. **Theriogenology.** v. 45, p. 1081-1089, 1996.

LIMAYE, P.V.; RAGHURAM, N.; SIVAKAMI, S. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. **Mol. And Cel. Biochemistry.** v. 243, p. 147-152, 2003.

LONERGAN, P.; O'KEARNEY-FLYNN, M.; BOLAND, M.P. Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. **Theriogenology.** v. 51, p. 1565-1576, 1999.

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

LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Biol. Reprod.** v. 5, nº 1, p. 5-17, 2005.

LUCIANO, A.M.; LODDE, V.; BERETA, M.S. et al. Developmental capability of denuded bovine oocyte in a co-cultured system with intact *cumulus*-oocyte complexes: role of *cumulus* cells, cyclic adenosine 3',5'-Monophosphate, and glutathione. **Mol. Reprod. Devel.** v. 71, p. 389-397, 2005.

De MATOS, D.G.; GAPARRINI, B.; PASQUALINI, S.R.; THOMPSON, J.G. Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. **Theriogenology.** v. 57, p. 1443-1451, 2002.

MOUATASSIM, S. EI; GUÉRIN, P.; MÉNÉZO, Y. Expression of genes encoding antioxidants enzymes in human and mouse oocytes during the final stages of maturation. **Mol. Hum. Reprod.** v. 5, nº 8, p. 720-725, 1999.

MOUATASSIM, S. EI; GUÉRIN, P.; MÉNÉZO, Y. Mammalian oviduct and protection against free oxygen radicals: expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse. **Obst. & Gynecol.** v. 89, p. 1-6, 2000.

PARK, J.I.; HONG, J.Y.; YONG, H.Y. et al. High oxygen tension during *in vitro* oocyte maturation improves *in vitro* development of porcine oocytes after fertilization. **Animal Reprod. Sci.** v. 87, p. 133-141, 2005.

PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up and percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. **Theriogenology.** v.44, p.859-869, 1995.

PEREIRA, D.C. Avaliação de diferentes sistemas de cultivo na produção *in vitro* de embriões bovinos. **Dissertação de Mestrado da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UnB**, julho, 2003.

PEREIRA, D.C.; DODE, M.A.N.; RUMPF, R. Evaluation of different culture systems on the *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology.** v. 63, p. 1131-1141, 2005.

PETERSEN, A.; MIKKELSEN, A.L.; LINDENBERG, S. The impact of oxygen tension on developmental competence of post-thaw human embryos. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.** v. 84, p. 1181-1184, 2005.

REMACLE, J.; LAMBERT, D.; RAES, M. et al. Importance of various antioxidant enzymes for cell stability. **Biochem. J.** v. 286, p. 41-46, 1992.

RIZOS, D.; LONERGAN, P.; BOLAND, M.P.; ARROYO-GARCIA, R.; PINTADO, B.; de la FUENTE, J.; GUTIÉRREZ-ADAN, A. Analysis of differential mRNA expression

between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. **Biol Reprod.** v.66, p.589-595, 2002a.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Mol. Reprod. Devel.** v. 61, p. 234-248, 2002b.

RIZOS, D.; GUTIÉRREZ-ADAN, A.; PÉREZ-GARNELO, S. et al. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, criotolerance, and Messenger RNA expression. **Biol. Reprod.** v. 68, p. 236-243, 2003.

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; MOREIRA, P. et al. Species-related differences in blastocyst quality are associated with differences in relative mRNA transcription. **Mol. Reprod. Devel.** v. 69, p. 381-386, 2004.

TAKAHASHI, M.; KEICHO, K.; TAKAHASHI, H. et al. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in-vitro cultured bovine embryos by comet assay. **Theriogenology.** v. 54, p. 137-145, 2000.

TILLY, J.L. and TILLY, K.I. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. **Endocrinology.** v. 136, n°1, p. 242-252, 1995.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reprod. Sci.** v. 60-61, p. 357-364, 2000.

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

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J.W. et al. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in pre-implantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. **Mol. Reprod. Devel.** v. 53, p. 8-18, 1999.

YUAN, Y.Q.; VAN SOOM, A.; COOPMAN, F.O.J.; MINTIENS, K. et al. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. **Theriogenology.** v. 59, p. 1585-1596, 2003.