

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós graduação em Ciências Biológicas
Mestrado em Genética e Biotecnologia

Michele Munk Pereira

**EFEITO DE DIFERENTES SISTEMAS DE MATURAÇÃO *IN VITRO* NO
POTENCIAL DE DESENVOLVIMENTO DE OÓCITOS BOVINOS**

Juiz de Fora

2010

Michele Munk Pereira

Efeito de diferentes sistemas de maturação *in vitro* no potencial de desenvolvimento de oócitos bovinos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Machado

Co-Orientador: Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Juiz de Fora

2010

Pereira, Michele Munk.

Efeitos de diferentes sistemas de maturação *in vitro* no potencial de desenvolvimento de oócitos bovinos / Michele Munk Pereira. – 2010.
75 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)—Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.

1. Embriologia. 2. Bovinos. I. Título.

CDU 611-013

MICHELE MUNK PEREIRA

Efeitos de diferentes sistemas de maturação *in vitro* no potencial de desenvolvimento de oócitos bovinos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em: 12/03/2010

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Marco Antônio Machado
Orientador
Embrapa Gado de Leite

Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo
Co-Orientador
Embrapa Gado de Leite

Prof^a.Dr^a. Martha de Oliveira Guerra
Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

À *Embrapa Gado de Leite*, por possibilitar a realização do experimento.

Ao *matadouro municipal de Juiz de Fora*, pela doação dos ovários.

À *FAPEMIG*, pelo apoio financeiro para a aquisição de material para a condução dos experimentos (Projetos CVZ1825/06 e CVZ APQ 1015-5.04/07).

Ao *CNPq*, pelo apoio financeiro.

À *CAPES*, pela concessão de bolsa de mestrado.

Ao *Dr. Marco Antônio*, pela confiança e oportunidade.

Ao *Dr. Luiz Sérgio*, pelos ensinamentos ao longo da minha formação acadêmica desde a iniciação científica até o mestrado.

Ao *Dr. João Henrique*, pelo apoio durante a realização dos experimentos e confecção dos artigos.

À *Dra. Lílian*, pela colaboração.

Ao *Dr. Lyderson*, por disponibilizar o *Laboratório de Genética no Instituto de Ciências Biológicas (UFJF)* para realização da microscopia de epifluorescência.

Aos estagiários do *Laboratório de Genética Molecular*, *Robert* e *Isabela* pelo auxílio na utilização dos equipamentos.

Aos amigos da *Embrapa Gado de Leite*, *André*, *Raquel*, *Paulo* e *Fernanda* na condução das atividades laboratoriais.

Aos amigos da *Embrapa Gado de Leite*, *Sabine*, *Ríbrio*, *Juliana*, *Carolzinha*, *Carolina*, *Joel* e *Myro* pela amizade e trabalho em equipe.

À *minha família*, por acreditarem em mim.

À *Dani*, pela amizade e companheirismo de sempre.

À todos os *meus amigos* que me incentivaram.

À *Deus*, por sempre estar ao meu lado.

"A possibilidade de realizar um sonho é
o que faz a vida ser interessante."
(Paulo Coelho)

RESUMO

A maturação *in vitro* de oócitos é um processo importante para a produção *in vitro* de embriões bovinos. O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito da interação do soro e tensão de oxigênio na maturação *in vitro*, sobre a maturação nuclear, viabilidade das células do *cumulus*, abundância de transcritos oocitários, desenvolvimento pré-implantacional e apoptose embrionária. Foram utilizados quatro grupos experimentais: G1 (10% soro de vaca no cio [SVC] em 20% de O₂); G2 (0,1% álcool polivinílico [PVA] em 20% de O₂), G3 (10% SVC em 5% de O₂) e G4 (0,1% PVA em 5% O₂). A proporção de oócitos em metáfase II, viabilidade das células do cumulus, taxa de blastocistos e número total de células não foi afetado (P>0,05) quando o soro foi substituído por PVA em 5% de O₂, enquanto a taxa de blastocistos e número total de células foi maior (P<0,05) no grupo com soro comparado com PVA, ambos em 20% O₂. O índice apoptótico foi menor em blastocistos produzidos a partir de oócitos maturados com PVA em 5% de O₂ (G4) em relação aos de outros grupos (G1, G2 e G3), mas não foi encontrada diferença (P>0,05) na taxa de maturação, viabilidade das células do *cumulus* e de blastocistos. Foram encontradas diferenças (P<0,05) na quantidade de transcritos específicos em oócitos maturados sobre as diferentes condições. Conclui-se que a presença de soro durante a maturação é importante para o desenvolvimento embrionário em tensão de 20% de O₂, e a suplementação com PVA em 5% de O₂ fornece o melhor ambiente de maturação para os oócitos, resultando em blastocistos com baixo índice apoptótico.

Palavras-chave: Blastocisto. Apoptose. Transcritos.

ABSTRACT

In vitro maturation is an important step for in vitro embryo production. The objective of the present study was to investigate the effect of the interaction of serum and oxygen tension during *in vitro* maturation on nuclear maturation, viability of cumulus cells, oocyte transcript amount, preimplantation development and blastocyst apoptosis. Four experimental groups were designed: G1 (10% estrus cow serum [ECS] with 20% O₂); G2 (0.1% polyvinyl alcohol [PVA] with 20% O₂), G3 (10% ECS with 5% O₂) e G4 (0.1% PVA with 5% O₂). Proportion of metaphase II oocytes, viability of cumulus cells, blastocyst rates and the total cell number were not affected (P>0.05) when the ECS was replaced by PVA under 5% O₂, whereas higher (P<0.05) blastocyst rate and total cell number were found with ECS than PVA, both under 20% O₂. Apoptosis index were lower in blastocysts from oocytes matured with PVA under 5% O₂ (G4) than blastocysts from other groups (G1, G2 and G3), but no differences (P>0.05) were found in nuclear maturation, viability of cumulus cells and blastocyst rate. Differences (P<0.05) in amount of specific transcripts were found in oocytes matured under different conditions. In conclusion, presence of serum during maturation is important for embryo development only when under 20% O₂, and maturation with PVA and 5% O₂ provides better environment for oocyte, resulting in blastocysts with low apoptosis index.

Keywords: Blastocyst. Apoptosis. Transcript.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fotografia 1 Micrografia de oócito em metáfase II após maturação <i>in vitro</i>	41
Fotografia 2 Expansão das células do <i>cumulus</i> após maturação <i>in vitro</i>	42
Gráfico 3 Viabilidade das células do <i>cumulus</i> após maturação <i>in vitro</i>	42
Gráfico 4 Efeito dos suplementos e atmosfera de maturação na qualidade morfológica de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i>	44
Fotografia 5 Detecção da fragmentação do DNA pela técnica de TUNEL em blastocistos oriundos de diferentes sistemas de maturação <i>in vitro</i>	44
Gráfico 6 Abundância relativa de transcritos de estresse celular, apoptose, transição materno-zigótica e maturação em oócitos maturados com SVC ou PVA em 20% de O ₂	47
Gráfico 7 Abundância relativa de transcritos de estresse celular, apoptose, transição materno-zigótica e maturação em oócitos maturados com SVC em 20% ou 5% de O ₂	47
Gráfico 8 Abundância relativa de transcritos relacionados ao estresse celular, apoptose, transição materno-zigótica em oócitos maturados com SVC em 20% ou PVA em 5% de O ₂	48
Gráfico 9 Curvas de dissociação dos genes PRDX1, HSP70.1, BAX, BCL-2 obtidas após amplificação por PCR em tempo real	49
Gráfico 10 Curvas de dissociação do gene ZAR1, MATER, HMG1 e GDF9 obtidas após amplificação por PCR em tempo real	49
Gráfico 11 Curva de dissociação do gene β-ACTINA obtidas após amplificação por PCR em tempo real	50
Fotografia 12 Verificação da presença dos transcritos dos genes PRDX1, HSP70.1, BAX, BCL-2; β-actina em oócitos maturados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	50
Fotografia 13 Verificação da presença dos transcritos dos genes GDF9, MATER, ZAR1, HMG1 em oócitos maturados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Descrição da qualidade embrionária	35
Tabela 2 Sequências dos <i>primers</i> específicos, temperaturas de pareamento, tamanho dos produtos e fonte de acesso às sequências no <i>GenBank</i>	37
Tabela 3 Efeito dos suplementos e atmosfera de maturação nas taxas de maturação nuclear de oócitos maturados <i>in vitro</i>	41
Tabela 4 Efeito dos suplementos e atmosfera de maturação nas taxas de clivagem e produção de embriões bovinos <i>in vitro</i>	43
Tabela 5 Efeito dos suplementos e atmosfera de maturação dos oócitos no n° total de células embrionárias, n° de células apoptóticas e índice apoptótico em embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i>	45
Tabela 6 Quantidade de cDNA, concentração de <i>primers</i> , temperatura de pareamento e temperatura de dissociação (TD) dos genes estudados nas condições padronizadas da PCR em tempo real	46
Tabela 7 Eficiência da reação e coeficiente de correlação (r) para cada gene nas condições padronizadas da PCR em tempo real	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGE	Ativação do Genoma Embrionário
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
ANOVA	Análise de Variância
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>
BCL2	<i>B Cell Leukemia</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
β-ME	β-Mercaptoetanol
C _T	<i>Cycle threshold</i>
cDNA	DNA complementar
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CCOs	Complexos <i>cumulus</i> -oócitos
CP	Corpúsculo Polar
DAPI	<i>4'6-diamidino-2-phenylindole</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAses	Desoxirribonucleases
EP	Erro padrão
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GAPDH	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
GDF9	<i>Growth Differentiation Factor-9</i>
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
HMGN1	<i>High Mobility Group N 1</i>
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
HSP70.1	<i>Heat shock protein 70.1</i>
IETS	<i>International embryo transfer society</i>
LH	Hormônio luteinizante
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
MATER	<i>Maternal antigen that embryo requires</i>
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mRNAs	Ácido ribonucleico mensageiros

PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	potencial de hidrogênio
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PRDX1	Peroxirredoxina 1
PVA	Álcool polivinílico
PVP	Polivinilpirrolidona
REST	<i>Relative expression software tool</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rTdT	Enzima recombinante desoxinucleotídeo transferase terminal
SAS	<i>Statistical analysis system</i>
SFB	Soro fetal bovino
SNK	<i>Student newman keuls</i>
SVC	Soro de vaca no cio
TCM 199	<i>Tissue Culture Medium 199</i>
TGFβ	Fator de Crescimento Transformante Beta
TMZ	Transição materno-zigótica
TUNEL	<i>Terminal deoxinucleotil transferase uracil nick end labeling</i>
UTR	Região não traduzida
VG	Vesícula germinativa
ZAR1	<i>Zygotic arrest 1</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Importância da produção <i>in vitro</i> de embriões	14
1.2 Aspectos do desenvolvimento do oócito	15
1.2.1 Crescimento e maturação oocitária	15
1.2.2 Transição materno-zigótica (TMZ)	18
1.3 Fatores que influenciam a maturação <i>in vitro</i>	20
1.3.1 Suplementos dos meios de maturação	21
1.3.2 Ambiente Atmosférico	23
1.4 Apoptose	25
1.5 Métodos de análise e quantificação de transcritos	27
2 HIPÓTESE	29
3 OBJETIVOS	30
3.1 Geral	30
3.2 Específicos	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Coleta dos oócitos	31
4.2 Maturação <i>in vitro</i>	32
4.3 Avaliação da taxa de maturação nuclear	33
4.4 Avaliação de viabilidade celular do <i>cumulus</i>	33
4.5 Fecundação <i>in vitro</i> dos oócitos e cultivo <i>in vitro</i> embriões	34
4.6 Avaliação do índice apoptótico dos embriões	35
4.7 Quantificação dos transcritos	36
4.7.1 Extração de RNA e síntese DNA complementar (cDNA)	37
4.7.2 PCR em tempo real	38
4.8 Análises estatísticas	40

5 RESULTADOS	41
5.1 Avaliação da taxa de maturação nuclear em oócitos maturados em meio livre de soro e em baixa tensão de O₂	41
5.2 Avaliação da viabilidade das células do <i>cumulus</i> após maturação <i>in vitro</i> em meio livre de soro e em baixa tensão de O₂	42
5.3 Efeito do meio sem soro e baixa tensão de O₂ na maturação <i>in vitro</i> de oócitos sobre o desenvolvimento pré-implantacional	43
5.4 Quantificação de transcritos armazenados em oócitos bovinos maturados <i>in vitro</i>	45
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotecnologia que pode ser aplicada na transferência nuclear, produção de animais transgênicos e multiplicação de rebanhos bovinos geneticamente superiores (HANSEL, 2003; CAMARGO *et al.*, 2006). No Brasil, a PIVE tem papel importante na produção animal, sendo que em 2007 o país realizou 195.811 (79,83%) do total das transferências de embriões bovinos produzidos *in vitro* no mundo (THIBIER, 2008).

Dentre as diversas etapas envolvidas na PIVE, a maturação *in vitro* (MIV) merece destaque, visto que o potencial de desenvolvimento do oócito *in vitro* pode ser influenciado pela suplementação proteica dos meios e atmosfera gasosa (WATSON *et al.*, 2000; WARZYCH *et al.*, 2007). O soro de vaca no cio (SVC) é rotineiramente aplicado como suplementação proteica na MIV, e o soro fetal bovino (SFB) no cultivo *in vitro* (CIV), pois contém fatores que estimulam o desenvolvimento embrionário e outros com ação antioxidativa (BAVISTER, 1995; ALI, BILODEAU e SIRARD, 2003). Contudo, o soro possui compostos em quantidades indefinidas (esteróides, colesterol e peptídeos) que alteram o metabolismo, a morfologia, a apoptose e a abundância de transcritos (FARIN, CROSIER e FARIN, 2001; CALDER *et al.*, 2005; WRENZYCKI, HERRMAN e NIEMMAN, 2007). Desta forma, a retirada do soro dos meios de maturação possibilita o estudo das reais necessidades para o desenvolvimento dos oócitos e pode reduzir os danos causados pela suplementação com esse composto. Uma alternativa pode ser a substituição do soro por macromoléculas sintéticas inertes como o álcool polivinílico (PVA) utilizado no CIV, possibilitando o estabelecimento de um sistema de maturação definido (VIREQUE *et al.*, 2009).

A atmosfera gasosa geralmente empregada em sistemas de MIV é de 5% de dióxido de carbono (CO₂) e 20% de oxigênio (O₂) (BAVISTER, 1995). Todavia, a tensão de O₂ no fluido folicular e na tuba uterina é menor (1,5 a 8,5%) (BANWELL *et al.*, 2007). A alta tensão de O₂ pode prejudicar o desenvolvimento pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que levam ao estresse oxidativo e apoptose (GUERIN, MOUATASSIM e MENEZO, 2001; UEDA *et al.*, 2002). Alguns estudos demonstraram que a produção de ROS foi maior em embriões cultivados

em 20% de O₂ quando comparado com 5% de O₂ (KITAGAWA *et al.*, 2004; FAVETTA *et al.*, 2007). Hashimoto *et al.* (2000) e Yuan *et al.* (2003) observaram que a baixa tensão de O₂ na MIV e no CIV pode melhorar a produção de embriões. No entanto, pouco se conhece sobre a interação do soro com a tensão de O₂ na MIV sobre o desenvolvimento do oócito e qualidade embrionária.

O ambiente de MIV pode alterar a abundância de ácido ribonucleico mensageiros (mRNAs) nos oócitos que afetam o desenvolvimento posterior (WATSON *et al.*, 2000; FAIR *et al.*, 2007; KATZ-JAFFE *et al.*, 2009). Assim como o soro, a tensão de O₂ pode alterar a expressão gênica de embriões cultivados *in vitro* (RINAUDO *et al.*, 2006; CORREA *et al.*, 2008). Porém, ainda não é conhecido o efeito da associação do soro com a tensão atmosférica sobre a quantidade de transcritos armazenados nos oócitos.

O objetivo deste estudo foi investigar a influência do soro e tensão de O₂ no potencial de desenvolvimento de oócitos bovinos *in vitro*.

1.1 Importância da produção *in vitro* de embriões

A PIVE é uma biotécnica com inúmeras aplicações. As biotecnologias de reprodução assistida podem auxiliar em programas de preservação de espécies ameaçadas de extinção. A PIVE aumenta o número de indivíduos, diminui o intervalo entre as gerações e possibilita que os gametas sejam congelados para a criação de bancos de germoplasmas (ANDRABI e MAXWELL, 2007). Embriões gerados pela PIVE podem ser utilizados nas pesquisas com células-tronco embrionárias, que são importantes na biomedicina para fins terapêuticos na regeneração de tecidos e órgãos em humanos com doenças degenerativas (GALLI e LAZZARI, 2008). A PIVE permite o estudo de eventos biológicos básicos que ocorrem na maturação do oócito, fertilização e desenvolvimento embrionário (SAGIRKAYA *et al.*, 2007), e que podem ser aplicados no tratamento de infertilidade em humanos (GILCHRIST e THOMPSON, 2007). Procedimentos desenvolvidos para a PIVE podem ser utilizados na técnica de transferência nuclear objetivando a produção de cópias de

indivíduos geneticamente superiores (MERTON *et al.*, 2003) ou de embriões geneticamente modificados contendo genes de interesse econômico, tais como resistência a doenças e desempenho reprodutivo (HANSEL, 2003).

Nos sistemas de produção animal, a PIVE tem sido amplamente utilizada na produção de bovinos (LONERGAN e FAIR, 2008). Com essa biotécnica, os embriões podem ser produzidos em grande escala, sexados, congelados e armazenados até a transferência para fêmeas receptoras (HANSEL, 2003). Estes embriões podem ser obtidos a partir de oócitos e espermatozoides de animais geneticamente superiores. Devido a essas vantagens o uso comercial da PIVE, em bovinos, tem aumentado de forma significativa nos últimos anos. Dados divulgados pelo *Data Retrieval Committee*, da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), registraram valores de mais de 245.257 embriões bovinos produzidos *in vitro* no mundo no ano de 2007. O Brasil foi responsável por aproximadamente 195.811 (79,83%) do total das transferências de embriões produzidos *in vitro* (THIBIER, 2008). Esses dados mostram que o país é um grande produtor de embriões *in vitro* no mundo devido à crescente demanda na pecuária de corte e de leite para a produção de alimentos (VARAGO, MENDONÇA e LAGARES, 2008).

1.2 Aspectos do desenvolvimento do oócito

1.2.1 Crescimento e maturação oocitária

O crescimento do oócito consiste em alterações ultraestruturais e moleculares que influenciam sua competência de desenvolvimento. O oócito aumenta seu diâmetro de menos de 30 μm até 120 μm , fase de folículo primordial até folículo terciário (HYTTEL *et al.*, 1997). Fair, Hyttel e Greve (1995) demonstraram que a capacidade de desenvolvimento dos oócitos aumenta gradualmente com o crescimento do folículo. Com o desenvolvimento do oócito ocorre a produção de

transcritos maternos que podem ser traduzidos imediatamente ou acumulados para sustentarem a meiose, fertilização, e mitoses iniciais do embrião até a ativação do genoma embrionário (AGE) (LEQUARRE *et al.*, 2004; KATZ-JAFFE *et al.*, 2009). Mudanças no comprimento da cauda poli (A) na região não traduzida 3' (3'UTR) dos mRNAs é um mecanismo bem conhecido na regulação temporal da tradução dos transcritos (STITZEL e SEYDOUX, 2007). Geralmente, os transcritos com cauda poli (A) curtas são traducionalmente inativos e os com caudas longas são ativos para a tradução (TELFORD, WATSON e SCHULTZ, 1990). A extensão ou o encurtamento da cauda poli (A) é regulada por proteínas que adicionam (adenilação) ou removem (deadenilação) adeninas na extremidade da região 3'UTR dos mRNAs. Nos oócitos, os transcritos tornam-se inativos pela deadenilação, e sua adenilação nos embriões é importante para se tornarem ativos e participarem da AGE (WATSON, 2007).

Embora a transcrição cesse após a quebra da vesícula germinal (VG), existem diferenças no perfil de transcritos em oócitos de camundongos e humanos maturados *in vitro* entre os estágios de VG e metáfase II (MII) (YOON *et al.*, 2005; ASSOU *et al.*, 2006). Provavelmente, esse fato está relacionado à utilização ou degradação dos transcritos maternos durante a maturação do oócito (BETTEGOWDA *et al.*, 2006; FAIR *et al.*, 2007). Além disso, genes de resposta ao estresse celular podem ter sua expressão induzida para proteger os oócitos de danos ambientais, como estresse calórico ou oxidativo (AL-KATANANI e HANSEN, 2002; CHRISTIANS *et al.*, 2003; LONERGAN *et al.*, 2003a; LEYENS, KNOOPS e DONNAY, 2004). Desta forma, alterações na quantidade de transcritos maternos podem afetar a competência de desenvolvimento do embrião (SCHULTZ, 2002; MERTON *et al.*, 2003; CAMARGO *et al.*, 2006; BREVINI *et al.*, 2007) e influenciar no estabelecimento de prenhes e produção de proles saudáveis (DIELEMAN *et al.*, 2002; LONERGAN *et al.*, 2003b; KRISHER, 2004; SIRARD *et al.*, 2006).

O processo de maturação envolve transformações que conferem ao oócito a capacidade de desenvolver-se até o estágio de blastocisto, sendo composta pelos seguintes eventos: maturação nuclear e citoplasmática. A maturação nuclear consiste na habilidade do núcleo em progredir na meiose. Na maioria dos mamíferos, a meiose inicia-se durante a vida fetal após as células germinativas primordiais darem origem aos oócitos que entram na primeira divisão meiótica (prófase I) e interrompem a meiose organizando seu núcleo em VG (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005). Em bovinos, o reinício da meiose ocorre após o surgimento

de uma onda do hormônio luteinizante (LH) ou com a remoção do oócito do folículo (GILCHRIST e THOMPSON, 2007). Esses eventos cessam o bloqueio meiótico mantido pelo mediador químico intracelular adenosina monofosfato cíclico (AMPC) presente no líquido folicular (VORONINA e WESSEL, 2003). Posteriormente, ocorre a quebra da VG, condensação dos cromossomos, formação do fuso bipolar, pareamento seguido da segregação dos cromossomos homólogos e extrusão do primeiro corpúsculo polar (CP) (SIRARD *et al.*, 2006). Então, o oócito completa a primeira divisão meiótica e sofre nova parada em MII até a fecundação ou ativação partenogenética. Em muitos mamíferos, tais como camundongos, bovinos e humanos a meiose é finalizada após a fecundação (EICHENLAUB-RITTER e PESCHKE, 2002) sendo caracterizada pela liberação do segundo CP.

A maturação citoplasmática consiste em modificações de organelas no citoplasma do oócito importantes para a fecundação e desenvolvimento pré-implantacional (LEONI *et al.*, 2007). Após estímulo hormonal ou retirada do oócito do folículo, as organelas passam por uma reorganização e a maioria migra para o centro. As mitocôndrias posicionam-se na região perinuclear, ocorre redução do complexo de golgi, os grânulos corticais acumulam-se ao longo da periferia do oolema atuando no bloqueio da polispermia durante a fecundação (VORONINA e WESSEL, 2003; VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

Durante o crescimento do oócito há um aumento da taxa de mitose das células da granulosa, contidas no folículo, que irão diferenciar-se em células do *cumulus* (FAIR, 2003). Estas células estão ligadas aos oócitos pelas junções tipo *gap*, atuando na transferência de íons, metabólitos e aminoácidos que regulam o crescimento e maturação do oócito (FAIR, 2003; KRISHER, 2004). As células do *cumulus* também modulam a atividade transcricional do oócito e facilitam a penetração espermática durante a fecundação (DE LA FUENTE e EPPIG, 2001). Por outro lado, os oócitos secretam fatores que induzem a proliferação e expansão das células do *cumulus* (EPPIG, 2001; CHAND *et al.*, 2006). Em oócitos imaturos as células do *cumulus* estão compactas e durante a maturação iniciam a secreção de ácido hialurônico o que causa a mucificação e separação das células, ocasionando a sua expansão (FULOP *et al.*, 2003). *In vivo* essa expansão é induzida pela onda de LH e *in vitro* esse estímulo pode ser feito com a adição de soro ou hormônio folículo estimulante (FSH) na MIV (SENBON *et al.*, 2004; GILCHRIST e THOMPSON, 2007).

Dentre os transcritos de importância para o desenvolvimento do oócito,

destaca-se o *Growth differentiation factor-9* (GDF9) que pertence à superfamília do fator de crescimento transformante beta (TGF- β) (EPPIG, 2001). Este fator de crescimento promove a expansão das células do *cumulus* pela indução da produção de ácido hialurônico durante a maturação (CHAND *et al.*, 2006). Em estudo realizado por Dong *et al.* (1996) foi observado que fêmeas de camundongos nocautes para o gene GDF9 apresentaram falhas na diferenciação dos oócitos. A expansão das células do *cumulus* é muito mais intensa durante a maturação *in vivo* do que *in vitro* (HENDRIKSEN *et al.*, 2000) e esta diferença pode estar associada à expressão de GDF9 ou a outros fatores relacionados ao ambiente *in vitro*.

1.2.2 Transição materno-zigótica (TMZ)

Durante o período entre a fertilização e a AGE, o desenvolvimento do embrião é sustentado por mRNAs e proteínas de origem materna sintetizados durante o crescimento e maturação do oócito (BREVINI *et al.*, 2007). O período em que os transcritos maternos são substituídos pelos transcritos embrionários é denominado TMZ (DIELEMAN *et al.*, 2002; MOUROT *et al.*, 2006; SCHIER, 2007; STITZEL e SEYDOUX, 2007). A transição entre a transcrição materna para a embrionária ocorre de maneira gradual envolvendo processos de degradação e/ou utilização de moléculas de mRNA e proteínas maternas, seguida da expressão de genes embrionários. O início de síntese de transcritos embrionários é específico para cada espécie. Em camundongos a AGE ocorre na fase de 2 células, em suínos com 4 células, em humanos com 8 células e em bovinos no estágio de 8-16 células (TELFORD, WATSON e SCHULTZ, 1990). Em bovinos, essa etapa coincide com o bloqueio no desenvolvimento embrionário observado em blastocistos produzidos *in vitro* (MEIRELLES *et al.*, 2004). Deste modo, espera-se que a qualidade dos oócitos influencie na capacidade do embrião em ultrapassar esse período de bloqueio, visto que o ooplasma promove a reprogramação do padrão de expressão gênica do embrião (SCHULTZ, 2002; MERTON *et al.*, 2003; CAMARGO *et al.*, 2006; BREVINI *et al.*, 2007).

Em mamíferos, a degradação dos transcritos maternos começa no início da maturação (SCHULTZ, 2002; STITZEL e SEYDOUX, 2007) e a maturação *in vitro* pode alterar os níveis de adenilação desses mRNAs influenciando sua estabilidade (PICCIONI, ZAPPAVIGNA e VERROTTI, 2005; WATSON, 2007). Portanto, é provável que a MIV inapropriada possa afetar a quantidade de transcritos por uma alteração na taxa de degradação dos mRNAs maternos, prejudicando o desenvolvimento embrionário.

Alguns transcritos de origem materna podem desempenhar funções mais relevantes durante o desenvolvimento inicial do embrião, como a *High Mobility Group N 1* (HMGN1). HMGN1 pertence a uma família de genes envolvidos com a estrutura e modulação da cromatina (FURUSAWA *et al.*, 2006). O transcrito desse gene produz uma proteína cromossomal não histônica que se liga ao nucleossomo, reduzindo a compactação da cromatina e favorecendo a transcrição (WEST, 2004; ZHU e HANSEN, 2007). O transcrito de HMGN1 está presente em quantidades elevadas em oócitos bovinos, declinando após a maturação e atingindo valor mais baixo no estágio de 8 células (VIGNEAULT *et al.*, 2004), sugerindo que esse mRNA materno pode estar sendo degradado lentamente ou então, sendo utilizado na TMZ.

Outro transcrito materno que pode ter função no desenvolvimento posterior do embrião é o *Maternal Antigen That Embryo Requires* (MATER). Oócitos de fêmeas de camundongos nocautes para esse gene não progridem além do estágio de 2 células após a fecundação (TONG *et al.*, 2000), período que coincide com a AGE em camundongos. Portanto, a ausência da proteína de MATER parece ter um efeito prejudicial durante a TMZ, sugerindo que a mesma possa ter papel importante na ativação do genoma embrionário (TONG *et al.*, 2004).

De maneira semelhante, o produto do gene *Zygotic Arrest 1* (ZAR1) pode influenciar o desenvolvimento do embrião. ZAR1 é um gene de efeito materno e foi primeiramente identificado em camundongos, em oócitos e embriões com 1 célula, mas estão ausentes em embriões no estágio de 4 células (WU *et al.*, 2003). Este gene pode estar envolvido na TMZ, pois foi demonstrado que oócitos de fêmeas de camundongos nocautes para o gene ZAR1, geralmente, não se desenvolvem além do estágio de 2 células (WU *et al.*, 2003).

Nos bovinos, transcritos maternos de MATER e ZAR1 foram detectados em oócitos e persistiram durante a MIV, e em embriões pré-implantação até o estágio de 5-8 células (PENNETIER *et al.*, 2004). Entretanto, a transcrição embrionária do gene

ZAR1 em embriões bovinos parece ocorrer no estágio de 4 células (BREVINI *et al.*, 2004). Deste modo, informações sobre variações da quantidade desses transcritos podem auxiliar no entendimento do potencial de desenvolvimento de oócitos maturados *in vitro*.

1.3 Fatores que influenciam a maturação *in vitro*

A produção de embriões é influenciada por diversos fatores, dentre eles destaca-se o potencial de desenvolvimento dos oócitos. O genótipo proveniente do oócito influencia diretamente na taxa de produção *in vitro* de embriões bovinos (BOEDIONO, SUZUKI e GODKE, 2003). A competência do oócito também pode ser influenciada por fatores ambientais como a temperatura (RENSIS e SCARAMUZZI, 2003), e pela interação entre genótipo e ambiente. Camargo *et al.* (2007) observaram que oócitos bovinos da raça Gir possuem maior potencial em se desenvolver até o estágio de blastocistos do que os da raça Holandesa. Esses mesmos autores sugerem que o genótipo dos oócitos obtidos em condições climáticas subtropicais influencia o sucesso da produção *in vitro* de embriões bovinos.

Na produção *in vivo* de embriões bovinos aproximadamente 80% do oócitos ovulados desenvolvem-se até blastocisto, enquanto que na produção *in vitro* apenas 40% atingem este estágio (LONERGAN e FAIR, 2008). A PIVE utilizando oócitos maturados *in vitro* é menos eficiente que com oócitos maturados *in vivo* (VAN DE LEEMPUT *et al.*, 1999; RIZOS *et al.*, 2002; HUMBLOT *et al.*, 2005), o que sugere que a MIV deve impor condições sub-ótimas para os oócitos imaturos se desenvolverem.

O potencial de desenvolvimento do oócito é adquirido gradualmente durante o desenvolvimento do oócito dentro do folículo. A PIVE envolve a coleta de oócitos imaturos para serem maturados *in vitro*, alterando o processo que ocorre *in vivo* e com isso, diminuindo a competência de desenvolvimento (HENDRIKSEN *et al.*, 2000; RIZOS *et al.*, 2002; KRISHER, 2004). A maturação nuclear também é alterada

em condições *in vitro*, pois quando os oócitos são removidos do ambiente folicular reiniciam espontaneamente a meiose (VORONINA e WESSEL, 2003). Este reinício, em muitos casos pode ser precoce e os oócitos podem não estar aptos citoplasmaticamente para maturar eficientemente (HYTTEL *et al.*, 1997). Como resultado, a maturação nuclear ocorre sem sincronia com a maturação citoplasmática necessária para completar o desenvolvimento do oócito (GILCHRIST e THOMPSON, 2007). A maturação citoplasmática também envolve a transcrição gênica que produzem transcritos que atuarão no desenvolvimento do oócito e nas fases iniciais do embrião (LEQUARRE *et al.*, 2004). Contudo, a retomada da meiose promove a condensação do nucléolo e parada da síntese de mRNA e proteínas (FAIR, HYTTEL e GREVE, 1995) limitando o programa molecular do oócito necessário para a TMZ.

As condições de MIV podem afetar os níveis de adenilação de mRNAs maternos (LEQUARRE *et al.*, 2004) e a interação de proteínas que estabilizam os transcritos (WATSON, 2007), tornando-os mais instáveis e susceptíveis à degradação enzimática (NIESSING, BLANKE e JACKLE, 2002). Estudos recentes do transcriptoma de oócitos bovinos por *microarray* identificaram genes ligados a apoptose, ciclo celular e produção de energia que tiveram a expressão alterada durante a MIV quando comparados a oócitos maturados *in vivo* (KATZ-JAFFE *et al.*, 2009), sugerindo que transcritos oocitários podem ser sensíveis ao ambiente *in vitro*. Portanto, estudos contínuos são necessários com o objetivo de mimetizar as condições de maturação *in vivo* visando o aprimoramento da maturação *in vitro*.

1.3.1 Suplementos dos meios de maturação

Os sistemas de MIV de oócitos bovinos normalmente utilizam o meio base de maturação denominado meio de cultura de tecido 199 (*Tissue Culture Medium 199 - TCM 199*) suplementado com hormônios, antibióticos e soro (FARIN, CROSIER e FARIN, 2001). A suplementação com soro nos meios de maturação *in vitro* tem sido utilizada em várias espécies domésticas, tais como ovelhas (CECCONI *et al.*, 1999), suínos (BOOTH, HOLM e CALLESEN, 2005) e bovinos (KRISHER, LANE e

BAVISTER, 1999; SENBON *et al.*, 2004; CALDER *et al.*, 2005). No cultivo embrionário, o soro geralmente aumenta as taxas de embriões, pois estimula o desenvolvimento, além de possuir ação antioxidativa diminuindo os efeitos deletérios causados pela produção de ROS (BAVISTER, 1995; THOMPSON, 2000; ALI, BILODEAU e SIRARD, 2003; SENBON *et al.*, 2004). Contudo, o soro contém vários hormônios e fatores de crescimento (LIM *et al.*, 2007), que podem variar de acordo com o lote ou partida coletada do animal, dificultando a padronização dos meios de cultivo e aumentando a variação no resultado.

O soro possui esteróides, colesterol e peptídeos, os quais os oócitos e embriões não são expostos *in vivo* (GARDNER, 1994). Além disso, o soro pode contaminar os meios de cultivo com patógenos, alterar o metabolismo, a morfologia, a criotolerância, a abundância de transcritos, a apoptose e causar anomalias no desenvolvimento embrionário pós-transferência, como a Síndrome do Bezerra Grande (BYRNE *et al.*, 1999; KHURANA e NIEMANN, 2000; FARIN, CROSIER e FARIN, 2001; ABE e HOSCHI, 2003; RIZOS *et al.*, 2003; CALDER *et al.*, 2005; LIM *et al.*, 2007; WRENZYCKI, HERRMAN e NIEMMAN, 2007). Um estudo realizado por Krisher, Lane e Bavister (1999) demonstrou que embriões cultivados com soro tiveram um aumento na taxa de glicólise. Por outro lado, embriões cultivados em meio quimicamente definido apresentaram taxa de glicólise semelhante aos embriões produzidos *in vivo* (JAVED e WRIGHT, 1991). Portanto, a utilização de meios quimicamente definidos é interessante para a produção *in vitro* de embriões, e apresentam várias vantagens: (I) padronizam os sistemas da PIVE; (II) possibilitam consistência de resultados entre os laboratórios; (III) previnem a contaminação dos meios com patógenos ou substâncias prejudiciais ao desenvolvimento; (IV) facilitam o estudo das reais necessidades para o desenvolvimento de oócitos e embriões (VANROOSE, VAN-SOOM e KRUIF, 2001). O PVA e o polivinilpirrolidona (PVP) são polímeros sintéticos inertes utilizados no meio de cultura celular como surfactantes, agentes quelantes de metais pesados e para a estabilização da pressão osmótica (HIRAO *et al.*, 2004). Estudos demonstraram que o PVA pode substituir o soro na MIV e no CIV sem alterar o desenvolvimento embrionário (WATSON *et al.*, 2000; LIM *et al.*, 2007; MINGOT *et al.*, 2009; VIREQUE *et al.*, 2009). Contudo, outros autores observaram perda de competência de desenvolvimento em oócitos que não receberam soro na maturação (MIZUSHIMA e FUKUI, 2000; WARZYCH *et al.*,

2007). Desta forma, mais estudos são necessários para a confirmação da capacidade de desenvolvimento de oócitos maturados em meios sem soro.

1.3.2 Ambiente atmosférico

O metabolismo aeróbico é um processo fisiológico normal que leva à formação de ROS, substâncias pró-oxidantes que em excesso causam estresse oxidativo nas células (LEYENS, KNOOPS e DONNAY, 2004; KITAGAWA *et al.*, 2004; FAVETTA *et al.*, 2007). A produção de ROS ocorre quando existe desvio de elétrons para o O_2 na cadeia respiratória mitocondrial e incluem ânions superóxidos (O_2^-), peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxilas (OH) que correspondem à redução por um, dois e três elétrons, respectivamente (GUERIN, MOUATASSIM e MENEZO, 2001). O H_2O_2 libera OH que são altamente reativas com outras moléculas citoplasmáticas causando danos celulares (KITAGAWA *et al.*, 2004). Em camundongos, foi demonstrado o efeito prejudicial da elevada concentração de H_2O_2 na formação do primeiro CP (TAMURA *et al.*, 2008) bem como na proporção de oócitos que atingem a MII (ZUELKE, JONES e PERREAULTS, 1997; ZHANG *et al.*, 2006).

A atmosfera gasosa geralmente utilizada em sistemas de MIV é de 5% de CO_2 e 20% de O_2 , com umidade saturada. O CO_2 é utilizado para controlar o potencial de hidrogênio (pH) dos meios tamponados com bicarbonato (BAVISTER, 1995). Por outro lado, a tensão de O_2 no fluido folicular e na tuba uterina é menor (1,5 a 8,5%) quando comparado ao ar atmosférico (20%) (BAVISTER, 1995; BANWELL *et al.*, 2007). A maturação *in vivo* ocorre no folículo pré-ovulatório e após a ovulação o oócito fica retido na tuba até o momento da fecundação. Deste modo, é possível que a baixa tensão de O_2 , próxima ao nível fisiológico, seja favorável à maturação dos oócitos. Em bovinos e camundongos, a baixa tensão de O_2 na MIV melhorou a competência de desenvolvimento dos oócitos refletida nas taxas e na qualidade dos blastocistos (HASHIMOTO *et al.*, 2000; ADAM *et al.*, 2004). No CIV, vários trabalhos já demonstraram que a baixa tensão de O_2 é benéfica para o

desenvolvimento dos embriões (YUAN *et al.*, 2003; KITAGAWA *et al.*, 2004; BOOTH, HOLM e CALLESEN, 2005; FAVETTA *et al.*, 2007). Contudo, em outros trabalhos a baixa tensão de O₂ na MIV não foi favorável ao desenvolvimento embrionário em bovinos e suínos (OYAMADA e FUKUI, 2004; PARK *et al.*, 2005). Booth, Holm e Callesen (2005) e Correa *et al.* (2008) não observaram diferença na taxa de blastocisto em 5 ou 20% de O₂ no CIV de embriões suínos e bovinos. Portanto, mais estudos são necessários para o melhor entendimento da influencia da atmosfera de maturação, bem como sua interação com soro, na competência de desenvolvimento de oócitos bovinos.

Nas células animais existem vários antioxidantes que modulam o acúmulo de ROS e esta interação determina a manutenção da homeostase intracelular. Um desequilíbrio entre esses compostos ocasiona o estresse oxidativo. Dentre os genes que apresentam ação antioxidante destaca-se a Peroxirredoxina 1 (PRDX1) e as proteínas de choque térmico (*Heat Shock Protein* - HSPs). A PRDX1 pertence a uma família de seis membros das peroxidases que atuam principalmente na decomposição de H₂O₂ produzidos nas células (LEYENS, KNOOPS e DONNAY, 2004). Os transcritos de PRDX1 estão presentes no citoplasma de oócitos e embriões bovinos (LEYENS, KNOOPS e DONNAY, 2004; MOUROT *et al.*, 2006) e seus níveis de expressão podem auxiliar no estudo da resposta celular ao estresse oxidativo. As HSP70.1 são chaperonas que, dentre outras funções, atuam na manutenção da estrutura proteica em condições fisiológicas adversas (CHRISTIANS *et al.*, 2003). A expressão constitutiva ou induzida de HSP70.1 produz proteínas que auxiliam na manutenção das funções celulares que são expostas a perturbações no microambiente de maturação, como o estresse oxidativo (AL-KATANANI e HANSEN, 2002; CHRISTIANS *et al.*, 2003) ou térmico (CAMARGO *et al.*, 2007). Assim, essa proteína parece desempenhar funções importantes no desenvolvimento de oócitos e embriões bovinos. A quantificação dos transcritos de PRDX1 e HSP70.1 pode ser utilizada na avaliação de condições de estresse celular nos sistemas de MIV e que, podem causar efeitos deletérios no período pós-fertilização ou no desenvolvimento tardio do embrião.

As ROS podem reagir com proteínas e lipídeos resultando na inativação de enzimas e peroxidação da membrana lipídica (JOHNSON e NASR-ESFAHANI, 1994), prejudicando a fusão entre o espermatozóide e oócito (AITKEN, HARKISS e BUCKINGHAM, 1993). Além disso, a presença de ROS em excesso nas células

induz ao processo de apoptose (BETTS e KING, 2001; GUERIN, MOUATASSIM e MENEZO, 2001; UEDA *et al.*, 2002). Um alto nível intracelular de ROS pode produzir instabilidade genômica gerando mutações ou quebras da molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) (KITAGAWA *et al.*, 2004). Yang *et al.* (1998) encontraram altos níveis de H₂O₂ em embriões degenerados quando comparados com embriões não degenerados. Portanto, é possível que a produção excessiva de ROS cause estresse oxidativo, e conseqüentemente, induza apoptose e morte embrionária.

1.4 Apoptose

A apoptose, também conhecida como morte celular programada, é um evento fisiológico natural, resultante de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos, coordenados geneticamente, que culmina com a morte da célula (SARASTE e PULKKI, 2000). Consiste em um mecanismo que regula o número total de células, removendo células com mutações ou danificadas, mantendo assim a homeostase nos organismos multicelulares (GJØRRET *et al.*, 2003; WARZYCH *et al.*, 2007). As características morfológicas da apoptose são: redução do volume celular, condensação de cromatina, fragmentação do DNA e formação de vesículas denominados corpos apoptóticos (BETTS e KING, 2001). Posteriormente, os corpos apoptóticos são fagocitados por células circunvizinhas, ou expulsos para o lúmen adjacente (SARASTE e PULKKI, 2000; MATWEE, BETTS e KING, 2000). Quando a morte celular apresenta todas as características de apoptose, mas foi induzida por estímulos físicos ou químicos, não constitui um processo programado e sim uma resposta celular às mudanças ambientais (KERR *et al.*, 2002).

O processo de apoptose é observado na formação e desenvolvimento de oócitos e embriões. Com o crescimento folicular, a maioria dos folículos entra em atresia e os oócitos degeneram pelo processo de apoptose (YANG e RAJAMAHENDRAN, 2002). Os oócitos inclusos nos folículos pré-ovulatórios, geralmente não entram em atresia e ovulam. Todavia, o processo de MIV pode induzir uma maior incidência de apoptose nos oócitos. Estudos realizados por Roth e

Hansen (2004) constataram que oócitos que passaram por estresse térmico durante a maturação *in vitro* apresentaram maior índice de apoptose. Portanto, é provável que embriões provenientes de oócitos maturados em condições insatisfatórias podem estar mais propensos a sofrerem apoptose.

Durante o período de desenvolvimento embrionário pré-implantacional a presença de blastômeros apoptóticos tem sido relatada em diversas espécies, incluindo camundongos (BANWELL *et al.*, 2007), suínos (KIDSON *et al.*, 2004), bovinos (WARZYCH *et al.*, 2007) e humanos (JURISICOVA, VARMUZA e CASPER, 1996). Porém, este processo é mais frequente em embriões produzidos *in vitro*, provavelmente, por influência das condições de cultura (GJØRRET *et al.*, 2003). Embriões produzidos *in vitro* com elevada degradação do DNA celular tornam-se inviáveis e degeneram (JURISICOVA, VARMUZA e CASPER, 1996; ANTUNES *et al.*, 2008).

Para a análise da apoptose em oócitos e embriões, geralmente, utiliza-se a técnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotil transferase Uracil Nick End Labeling*) (GJØRRET *et al.*, 2003; KIDSON *et al.*, 2004; ROTH e HANSEN, 2004; BANWELL *et al.*, 2007; ANTUNES *et al.*, 2008). Esta técnica identifica *in situ*, a fragmentação do DNA gerada pela atividade de desoxirribonucleases (DNAses) endógenas durante o processo apoptótico. Consiste em um sistema que incorpora de forma catalítica o corante fluoresceína-12-dUTP à hidroxila terminal do DNA degradado, utilizando a enzima recombinante desoxinucleotídeo transferase terminal (rTdT). O DNA corado pela fluoresceína-12-dUTP pode ser diretamente visualizado por microscopia de fluorescência.

Além da técnica de TUNEL, o estudo da apoptose também pode ser realizado pela quantificação de transcritos envolvidos com o processo apoptótico. Yang e Rajamahendran (2002) observaram que a taxa de transcritos de *B cell leukemia 2* (BCL-2; gene antiapoptótico), e do *BCL-2 associated X protein* (BAX; gene pró-apoptótico), pode ser utilizada para avaliar a tendência das células em sobreviver ou entrarem em apoptose. Proteínas do gene BCL-2 evitam a liberação do citocromo C pela membrana da mitocôndria, enquanto a proteína do gene BAX induz a liberação dessa molécula (JOHNSON *et al.*, 2003). A liberação do citocromo C provoca a ativação de uma cascata de caspases que clivam outros substratos provocando a apoptose (MATWEE, BETTS e KING, 2000). O balanço desses transcritos é importante para a regulação da sobrevivência em oócitos (BETTS e KING, 2001;

TILLY, 2001) e, conseqüentemente, dos embriões que herdam esses transcritos maternos (MEIRELLES *et al.*, 2004).

1.5 Métodos de análise e quantificação de transcritos

A quantificação de transcritos armazenados nos oócitos é importante para o monitoramento dos sistemas de MIV e podem ajudar no entendimento dos fatores que controlam a aquisição do potencial de desenvolvimento. Análises de expressão gênica têm sido utilizadas com sucesso no estudo da transcrição de genes durante os processos de crescimento do oócito, maturação e desenvolvimento embrionário (WATSON *et al.*, 2000; LECHNIAK, 2002; LEQUARRE *et al.*, 2004; CALDER *et al.*, 2005; BETTEGOWDA *et al.*, 2008). Diferentes quantidades de alguns mRNAs têm sido associadas com a competência de desenvolvimento dos oócitos (MOUROT *et al.*, 2006; LEONI *et al.*, 2007; BETTEGOWDA *et al.*, 2008; KATZ-JAFFE *et al.*, 2009). Com essas informações, os sistemas de MIV podem ser aprimorados visando o aumento das taxas de produção e qualidade dos blastocistos.

Vários métodos foram desenvolvidos para a quantificação de transcritos, como *Northern Blot*, hibridização *in situ* e transcrição reversa associada com a reação em cadeia da enzima polimerase (RT-PCR). Todavia, esses métodos possuem limitações devido à baixa sensibilidade na detecção dos transcritos nas amostras (BUSTIN, 2000). A utilização dessas técnicas demanda uma grande quantidade de material inicial, dificultando a aplicação em amostras pequenas ou com transcritos raros, como é o caso de oócitos e embriões bovinos.

Para superar essas dificuldades, foi desenvolvida a técnica de PCR em tempo real, amplamente utilizada na quantificação de mRNA, sendo que uma das suas vantagens é ser altamente sensível (BETTEGOWDA *et al.*, 2006). Com esse método, é possível detectar pequenas quantidades de transcritos nas amostras, principalmente, naquelas com limitado número de células e transcritos raros (LECHNIAK, 2002). Além disso, também fornece maior precisão, pois pode detectar poucas cópias de DNA (KLEIN, 2002). Outra vantagem é o fato da técnica de PCR em tempo real não exigir, necessariamente, a análise do produto em gel de

eletroforese. Após a reação, pode ser construída uma curva de desnaturação, para identificar a presença de contaminantes, através da avaliação da temperatura de desnaturação. Mais ainda, a reação pode ser monitorada em tempo real, pela utilização de fluorescência repórter (como exemplo o corante *Syber Green*) que pode ser detectada ao final da etapa de extensão de cada ciclo da PCR e permite monitorar a quantidade crescente de DNA amplificado (BUSTIN, 2000). Assim, as amostras são quantificadas utilizando o número de ciclos necessários para que o acúmulo do produto de PCR, representado pela fluorescência emitida, atinja determinado nível ou ponto considerado como estatisticamente significativo (linha limiar - *threshold cycle* - C_T) (LECHNIAK, 2002). De modo que o C_T é utilizado como base para comparação entre as amostras.

Para realizar a análise dos transcritos após a PCR em tempo real duas estratégias de quantificação podem ser utilizadas: quantificação absoluta e relativa. Na quantificação absoluta é determinado o número exato de moléculas de transcritos na amostra, pela comparação do C_T do gene alvo com uma curva de calibração padrão (PFAFFL, HORGAN e DEMPFLER, 2002). Essa curva é gerada após diluições seriadas de um RNA padrão (BUSTIN, 2002). Na quantificação relativa são realizadas análises comparando-se o C_T do gene alvo em relação ao C_T do gene endógeno (PFAFFL, HORGAN e DEMPFLER, 2002).

Vários trabalhos já utilizaram a técnica de PCR em tempo real para a quantificação de transcritos em oócitos bovinos (WATSON *et al.*, 2000; LEQUARRE *et al.*, 2004; CALDER *et al.*, 2005; BETTEGOWDA *et al.*, 2008), todavia, pouco se sabe sobre a influência da interação do soro e tensão de oxigênio na quantidade de transcritos em oócitos bovinos maturados *in vitro*.

2 HIPÓTESE

A maturação *in vitro* em meio livre de soro e baixa tensão de oxigênio pode ser benéfica para o desenvolvimento de oócitos bovinos *in vitro*.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar diferentes condições de maturação *in vitro* no desenvolvimento de oócitos bovinos *in vitro*.

3.2 Específicos

- Avaliar a progressão da meiose e a viabilidade das células do *cumulus* em oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio livre de soro e em baixa tensão de oxigênio.
- Avaliar o efeito do meio sem soro e baixa tensão de oxigênio durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre o desenvolvimento pré-implantacional, número total de células e índice apoptótico de blastocistos produzidos *in vitro*.
- Avaliar a relação da classificação morfológica de embriões bovinos com o nível de apoptose embrionário.
- Quantificar transcritos armazenados no oócito, relacionados com a maturação (GDF9), transição materno-zigótica (HMGN1, MATER, ZAR1) estresse oxidativo (PRDX1 e HSP70), e apoptose (BAX e BCL-2), entre oócitos bovinos maturados sob diferentes condições *in vitro* (suplementação proteica e tensão de oxigênio).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nos Laboratórios de Reprodução Animal e Genética Molecular Dr. Mário Luiz Martinez na Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG. Oócitos bovinos imaturos foram maturados em diferentes sistemas *in vitro*. Após a maturação foi avaliada a taxa de maturação nuclear, viabilidade das células do *cumulus*, potencial de desenvolvimento pré-implantacional e abundância de transcritos oocitários.

O experimento foi constituído de quatro grupos:

- Grupo I: complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) maturados em meio TCM 199 (Nutricell, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de SVC em estufa incubadora com 20% de O₂, 5% de CO₂, em ar e umidade de 95% (Controle).
- Grupo II: CCOs maturados em meio TCM 199 suplementado com 0,1% de PVA (Sigma, Saint Louis, EUA) em estufa incubadora com 20% de O₂, 5% de CO₂, em ar e umidade de 95%.
- Grupo III: CCOs maturados em meio TCM 199 suplementado com 10% de SVC em estufa incubadora com 5% de O₂, 5% de CO₂ e umidade de 95%.
- Grupo IV: CCOs maturados em meio TCM 199 suplementado com 0,1% de PVA em estufa incubadora com 5% de O₂, 5% de CO₂ e umidade de 95%.

4.1 Coleta dos oócitos

Visando minimizar componentes genéticos, ovários de vacas predominantemente mestiças (Holandês-Gir) oriundos de rebanhos de gado de leite

da região de Juiz de Fora, foram coletados no matadouro local para a obtenção dos oócitos imaturos. Os ovários foram obtidos logo após o abate e transportados para o laboratório em solução fisiológica, acrescida de penicilina e estreptomicina (Sigma) à temperatura de 35°C para a aspiração de oócitos imaturos para a maturação *in vitro*.

4.2 Maturação *in vitro*

No laboratório, os ovários foram mantidos em solução fisiológica, acrescida de penicilina e estreptomicina a 35°C. Foram aspirados folículos visíveis com diâmetro de 2 a 8 mm, com auxílio de seringa descartável de 10 mL e agulha de 25 x 8 mm. Após 10 minutos de decantação, o sobrenadante foi descartado, o precipitado foi lavado com meio Talp-Hepes (GORDON, 2004) e vertido em placa de Petri descartável de 100 x 20 mm. Foram selecionados os CCOs imaturos (n= 2.250) que apresentaram citoplasma homogêneo com no mínimo duas a três camadas compactas de células (VIANA *et al.*, 2004). Grupos de 30-40 estruturas foram distribuídos aleatoriamente em poços de placas tipo *Nunc* com 400 µL de meio TCM 199 suplementado com 2 µg de hormônio folículo estimulante (FSH; Pluset, Barcelona, Espanha), e maturados *in vitro* de acordo com os grupos experimentais, em atmosfera com umidade de 95%, a 38,5 °C por 24 horas. Após a maturação três *pools* de 10 oócitos de cada grupo tiveram suas células do *cumulus* removidas com 1% de hialuronidase (Sigma), em meio Talp Hepes, congelados em nitrogênio (N₂) líquido e mantidos armazenados em *freezer* -80°C até o momento da extração do RNA total.

O restante dos oócitos foi utilizado para a avaliação da maturação nuclear, viabilidade das células do *cumulus* e fertilizados *in vitro* a fim de se avaliar o potencial de desenvolvimento até o estágio de blastocisto.

4.3 Avaliação da taxa de maturação nuclear

Após a maturação *in vitro*, oócitos de cada grupo foram desnudados por agitação em vórtex, fixados em lâmina em solução de metanol e ácido acético (3:1) por 12 horas e, posteriormente, corados com orceína acética a 1% (Sigma). As lâminas com os oócitos foram observadas sob microscopia óptica de imersão (1000x) (Nikon, 1.25, Tóquio, Japão), imediatamente após a coloração e classificados como: metáfase II (MII) - cromossomos haplóides condensados, com a presença do corpúsculo polar; metáfase I (MI) – cromossomos bivalentes condensados; não identificados (NI) - oócitos não identificados na fase da meiose; Degenerado (DG) - oócitos vacuolizados, não sendo possível a visualização dos cromossomos.

4.4 Avaliação da viabilidade celular do *cumulus*

Após a maturação *in vitro*, as células do *cumulus* de cada grupo foram removidas com 1% de hialuronidase em meio Talp-Hepes. As células do *cumulus* foram separadas dos oócitos desnudos, lavadas duas vezes em Talp-Hepes acrescido de 0,1% de PVA e submetidas à coloração com o Azul de Tripán (Sigma). Foi diluída 250 µL de suspensão celular com 250 µL do Azul de Tripán a 0,04% em um tubo Falcon de 15 mL (1:1). Este tubo foi mantido em banho-maria por 20 minutos a 37°C. Em seguida, foi realizada a centrifugação por 5 minutos a 1800 rpm, o sobrenadante foi retirado e as células lavadas com Talp- Hepes até o *pellet* ficar claro. Foram utilizados 5 µL do *pellet* e transferidos para um *ependorf* com 95 µL de água destilada para o cálculo da concentração (1:20). O corante Azul de Tripán avalia a integridade da membrana celular (JEWGENOW *et al.*, 1998), nas células do *cumulus* não viáveis (membranas danificadas) ocorreu à penetração do corante. As células coradas foram visualizadas e contadas com auxílio de microscópio óptico (Nikon). Foi contado o número de células em azul e o de células brancas. O número de células coradas em azul representou o número de células inviáveis da amostra.

4.5 Fecundação *in vitro* dos oócitos e cultivo *in vitro* dos embriões

Após 24 horas de maturação *in vitro*, os oócitos de cada grupo foram fecundados *in vitro* com sêmen descongelado de touro da raça Gir. O sêmen utilizado foi testado previamente no laboratório quanto à capacidade de desenvolvimento de embriões de fertilização *in vitro* (FIV), de modo que, durante todo o experimento foi utilizada a mesma partida de sêmen do mesmo touro. Para a seleção dos espermatozoides foi usado o método do gradiente de Percoll (Nutricell) com as concentrações de 45% e 90% (PARRISH *et al.*, 1995). A FIV foi realizada em gotas de 100 µl de meio Fert-Talp (GORDON, 2004) acrescido de 10 UI/mL de heparina (Sigma). As gotas continham uma concentração espermática de $2,0 \times 10^6$ espermatozoides/mL, e foram cobertas com óleo mineral e mantidas por período aproximado de 22 horas em estufa incubadora com 5% de CO₂, umidade de 95% a 38,5 °C. Posteriormente, os possíveis zigotos foram totalmente desnudados em meio Talp-Hepes com 1% de hialuronidase, e em seguida, transferidos para placas de tipo *Nunc* contendo 400 µL de meio de cultivo CR2aa (WILKINSON *et al.*, 1996) acrescido de 2,5% de soro fetal bovino (SFB) sob óleo mineral. O cultivo foi realizado em estufa incubadora a 38,5°C, 5% de O₂, 5% de CO₂, e umidade de 95%.

A avaliação da taxa de clivagem foi realizada 72 horas após a fecundação. A taxa de produção de blastocistos foi avaliada no sétimo (D7) e oitavo (D8) dia do cultivo. No D8 foi feita a classificação morfológica dos embriões, utilizando estereomicroscópio (Olympus, SZ40, Washington, EUA), segundo Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embrião (IETS) (STRINGFELLOW e SEIDEL, 1998). (Tabela 1).

Tabela 1: Descrição da qualidade embrionária (adaptado de STRINGFELLOW e SEIDEL, 1998).

Classificação	Descrição
Grau I	Excelente ou bom: massa embrionária simétrica com blastômeros individuais, que são uniformes em tamanho, cor e densidade. Este embrião é consistente com seu estágio esperado de desenvolvimento. Irregularidades devem ser relativamente menores e ao menos 85% do material celular devem ser de massa embrionária viável intacta. A zona pelúcida deve ser lisa e não ter superfícies côncavas ou planas.
Grau II	Regular: irregularidades moderadas na forma geral de massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais. Ao menos 50% do material celular devem compor uma massa embrionária viável, intacta.
Grau III	Pobre: irregularidades maiores na forma da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais. Ao menos 25% do material celular devem formar uma massa embrionária viável, intacta.
Grau IV	Morto ou degenerado: embriões em degeneração, oócitos ou embriões de uma célula: não viáveis.

4.6 Avaliação do índice apoptótico dos embriões

A fragmentação do DNA foi avaliada como indicador de apoptose em células embrionárias, utilizando o Kit comercial *Dead End Fluorimetric TUNEL System* (Promega, Madison, WI, EUA). Após o D8 de cultivo, blastocistos provenientes dos quatro grupos de maturação foram separadamente lavados em gotas de 100 µl de solução salina fosfatada (Nutricell) acrescida de 0,1% de albumina sérica bovina (*bovine serum albumin* – BSA; Sigma), fixados em formaldeído 4%, lavados novamente e armazenados em criotubos com solução salina fosfatada acrescida de 0,1% BSA por 1 semana a 4°C.

Para a confecção das lâminas, os embriões foram inicialmente permeabilizados por imersão em solução de 0,2% de *Triton X-100* em solução salina fosfatada, e incubados em gotas de tampão de equilíbrio, *mix* de nucleotídeos, enzima rTdT e corante de fluoresceína-12-dUTP, que cora o DNA fragmentado, onde permaneceram a 37°C por 1 hora em câmara úmida coberta com papel alumínio. No controle negativo, os embriões foram incubados com tampão de equilíbrio sem enzima rTdT. No controle positivo, os embriões foram incubados com tampão de

equilíbrio, enzima DNase (para promover a degradação do DNA nas células do embrião) e a enzima fluoresceína-12-dUTP. Passada esta etapa, os embriões foram transferidos para lâmina, corados com 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) em *Vectashield* (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, EUA), um corante de fluorescência, e recobertos com lamínula.

Todos os blastômeros embrionários foram marcados pelo DAPI e visualizados em azul no filtro de 460 nm do microscópio de epifluorescência (BX 52, Olympus, Washington, EUA). As células embrionárias em apoptose foram identificadas no filtro de 520 ± 20 nm corando-se de cor verde pela fluoresceína. As lâminas foram observadas em microscópio de epifluorescência e as imagens foram capturadas utilizando o programa *Image-Pro Plus 4.5* (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). Posteriormente, o número total de células e o número de células apoptóticas foram analisados utilizando o programa *Image J* (versão 1.42e, dezembro de 2008).

O índice apoptótico foi calculado a partir da relação do número total de células e o número de células contendo corpos apoptóticos (KIDSON *et al.*, 2004).

4.7 Quantificação dos transcritos

Os *primers* (HSP70.1, BAX, BCL-2, ZAR1, MATER, HMGN1, GDF9 e β -ACTINA) foram desenhados a partir de sequências disponíveis no banco de dados do *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando o programa *Primer3* (ROZEN e SKALETSKY, 2000), e os *primers* (PRDX1 e Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase - GAPDH) foram produzidos de acordo com Mourot *et al.* (2006). Todos os *primers* foram sintetizados pela *Integrated DNA Technologies* (Coralville, IA, EUA) e estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Sequência dos *primers* específicos, temperaturas de pareamento, tamanho dos produtos e fonte de acesso às sequências no *GenBank*

Produto	Sequência do <i>primer</i>	Temperatura de pareamento	Tamanho do produto (pb)	N° de acesso no GenBank/Referência
PRDX1	F 5'ATGCCAGATGGTCAGTTCAAG3' R 5'CCTTGTCTTGGGTGTGTTG3'	53°C	224	Mourot <i>et al.</i> (2006)
HSP70.1	F 5'ACAAGATCACCATACCAACG3' R 5'TCCTTCTCCGCCAAGGTGTTG3'	59°C	275	NM174550
BAX	F 5'TTTGCTTCAGGGTTTCATCCAGGA3' R 5'CAGCTGCGATCATCCTCTGCAG3'	64°C	174	NM173894
BCL-2	F 5'TGGATGACCGAGTACCTGAA3' R 5'CAGCCAGGAGAAATCAAACA3'	53°C	120	XM_586976
ZAR1	F 5'TGCCGAACATGCCAGAAG3' R 5'TCACAGGATAGGCGTTTGC3'	53°C	188	NM_001076203
MATER	F 5'TAATGACGACGCTGTGTTCTG3' R 5'GCGGTTCTCAGGTTCTTCAG3'	53°C	206	NM_001007814
HMGN1	F 5'GTGGCCAACCAGGAGACTAA3' R 5'AAACAGGGACCACTGACAGG3'	53°C	147	NM_003598
GDF9	F 5'GACCCCTAAATCCAACAGAA3' R 5'AGCAGATCCACTGATGGAA3'	53°C	120	NM_174681
β -ACTINA (endógeno)	F 5'GACATCCGCAAGGACCTCTA3' R 5'ACATCTGCTGGAAGGTGGAC3'	53°C	205	NM_173979
GAPDH (endógeno)	F 5'CCAACGTGTCTGTTGTGGATCTGA3' R 5'GAGCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG3'	53°C	237	Mourot <i>et al.</i> , (2006)

4.7.1 Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)

A extração do RNA foi realizada utilizando-se o kit comercial *RNeasy Micro kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha). A lise das células foi feita com tampão RLT acrescido de 10% de β -Mercaptoetanol (β -ME; Gibco Brl Life Technologies, Nova York, EUA). O lisado foi homogeneizado, acrescido de etanol a 70% e transferido para uma coluna de obtenção do RNA. Para lavagem foi adicionado tampão RW1, e posteriormente foi realizada a incubação com solução de DNase por 15 minutos. Após este período ocorreu novamente à lavagem com o tampão RW1 e com o tampão RPE. Em

seguida, foi feita a adição de etanol a 80% na coluna e centrifugação para secar a membrana onde estava contido o RNA. Para eluição, foram utilizados 12 μL de água RNase-free, gerando um volume final de aproximadamente 11 μL (~55 ng).

A transcrição reversa foi obtida com o kit comercial *SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix* (Invitrogen, Califórnia, EUA). Brevemente, 6 μL (~30ng) de RNA foram utilizados em cada reação de síntese de cDNA. Uma reação contendo RNA, *primer* oligo dT, tampão de pareamento e água livre de RNase/DNase foi incubada por 5 minutos a 65°C. Em seguida, 12 μL de um *mix* (2X *First-Strand reaction mix* e *SuperScript III RNaseOUT Enzyme mix*) foi adicionado à reação e esta foi incubada a 50°C por 50 minutos, seguido de 85°C por 5 minutos. O volume final foi de 20 μL (~14.000 ng) de cDNA por reação.

Após a extração e transcrição reversa, 1 μL do RNA e cDNA de cada amostra foram avaliados em espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000, Wilmington, EUA), para análise da concentração e pureza do material. O cDNA de cada grupo experimental permaneceu estocado em freezer a -80°C até posterior utilização.

4.7.2 PCR em tempo real

Antes da quantificação dos transcritos pela PCR em tempo real, as concentrações dos *primers* e de cDNA foram padronizadas. Foram utilizadas quantidades de cDNA associadas às concentrações de *primers* que produzissem reações de PCR em tempo real com as maiores eficiências (de acordo com as concentrações de cDNA e *primers* escolhidas). Foram testadas três quantidades de cDNA (50, 100 e 200 ng) em uma diluição de *primer* de 400 nM para cada um dos genes (PRDX1, HSP70, BAX, BCL-2, GDF9, HMG1, TEAD2, MATER, ZAR1, GAPDH e β -ACTINA). Adicionalmente, para os genes (PRDX1, HSP70, BAX, BCL-2) foram testadas mais duas concentrações de cDNA (400 e 600 ng) em uma diluição de *primer* de 100 nM. A eficiência de cada reação foi calculada utilizando o *software LinRegPCR* (RAMAKERS *et al.*, 2003). Os valores logarítmicos de fluorescência em cada ciclo foram utilizados para obtenção da inclinação da reta, calculada a partir de

regressão linear simples, e para o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson. Na análise de cada reação, somente os pontos com coeficiente de correlação entre 0,999 e 1 foram utilizados para o cálculo da eficiência. Desta forma foi possível obter a eficiência de cada reação individualmente. O valor de inclinação da reta foi empregado na fórmula: $Eff = 10^{-1/slope}$, onde $Eff = 1$, transcrição mínima e $Eff = 2$, transcrição máxima ou eficiência máxima (RAMAKERS *et al.*, 2003).

Após padronização, foram feitas reações com o kit comercial *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A reação contendo cDNA, par de *primers*, *Master Mix* (dNTPs, referência passiva-ROX, *SYBER Green*) e 0,1 U de Taq DNA Polimerase, em um volume final de 25 µL, foi incubada a 95°C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos, temperatura de pareamento específica para cada *primer* (tabela 2) por 30 segundos e extensão a 60°C por 30 segundos. Controles negativos foram preparados em que o cDNA foi omitido durante a reação. Foram feitas reações em triplicata para cada amostra (de todos os grupos) das respectivas repetições em placas ópticas de reação de 96 poços (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), seladas com filme adesivo óptico e amplificadas no aparelho de PCR em tempo real (*ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems, Applied Biosystems*).

A quantificação relativa foi realizada utilizando-se o método do C_T comparativo, com os resultados expressos em relação a genes de referência endógena e um grupo calibrador (grupo controle). Os genes de referência endógena foram GAPDH e β -ACTINA, pois estes genes são utilizados em vários trabalhos de expressão gênica em oócitos bovinos (MOUROT *et al.*, 2006; SAGIRKAYA *et al.*, 2007) e têm fornecido bons resultados por apresentar pouca variação nos níveis de mRNA durante a MIV (BETTEGOWDA *et al.*, 2006). Como grupo calibrador foi utilizado o sistema de maturação padrão (suplementação com SVC em 20% de O_2), normalmente utilizado nos laboratórios de PIVE.

Os produtos amplificados foram analisados também em gel nativo de poli-acrilamida a 8% e corados com nitrato de prata, para a verificação dos tamanhos dos fragmentos dos genes estudados e validação dos resultados obtidos pela PCR em tempo real. As análises da quantificação relativa dos genes PRDX1, HSP70, BAX, BCL-2, ZAR1, MATER, HMG1 e GDF9 foram realizadas de acordo com o método descrito por Pfaffl, Horgan e Dempfle (2002) que utiliza o seguinte modelo matemático:

$$\text{Quantidade Relativa} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta CT_{\text{alvo}} (\text{média do controle} - \text{média da amostra})}}{(E_{\text{Ref}})^{\Delta CT_{\text{Ref}} (\text{média do controle} - \text{média da amostra})}}$$

Onde:

E_{alvo} = Eficiência da PCR dos genes alvo.

Controle = grupo controle.

Amostra = grupo teste.

E_{Ref} = Eficiência da PCR do gene controle endógeno.

A partir deste método foi desenvolvido o *Relative Expression Software Tool* (REST®) (PFAFFL, HORGAN e DEMPFLER, 2002) que possui o modelo estatístico *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation TEST®* (versão 384 - Beta, 2005) o qual foi utilizado para analisar os dados obtidos da quantificação relativa da PCR em tempo real. Esse modelo foi desenvolvido com base em testes de permutação, que são uma alternativa a ser utilizada quando testes paramétricos não podem ser usados. Esses testes obtêm resultados a partir de permutações aleatórias dos dados do experimento.

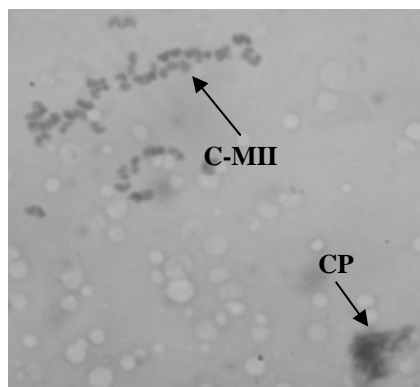
4.8 Análises estatísticas

Para a análise das taxas de maturação nuclear, viabilidade das células do *cumulus*, taxas de clivagem, produção de blastocistos, qualidade morfológica dos embriões, número total de células embrionárias, número de células apoptóticas e índice apoptótico foi utilizada a análise de variância (ANOVA). As diferenças entre médias foram comparadas pelo teste de *Student Newman Keuls* (SNK) através do procedimento GLM do programa Sistema de análises estatísticas (*Statistical Analysis System* - SAS). Os valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos. Os valores foram apresentados como médias \pm erro padrão (EP) da média.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da taxa de maturação nuclear em oócitos maturados *in vitro* em meio livre de soro e em baixa tensão de O₂

Utilizando a coloração com orceína acética foi analisada a progressão da meiose em oócitos submetidos a diferentes sistemas de MIV (Fotografia 1). Não houve diferença entre os grupos ($P>0,05$) quanto às taxas de metáfase II e metáfase I (Tabela 3).



Fotografia 1. Micrografia de oócito em metáfase II (C-MII – cromossomos haplóides em metáfase II; CP- corpúsculo polar). Aumento: 1000X.

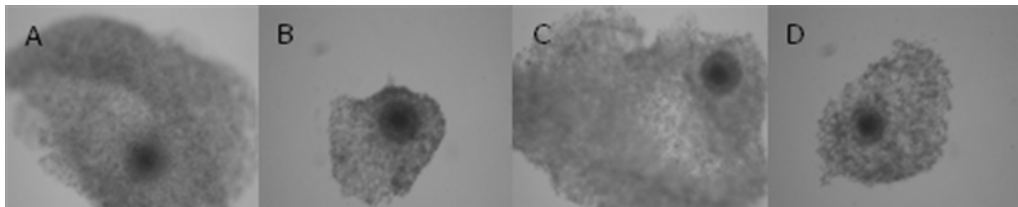
Tabela 3: Efeito da suplementação e tensão atmosférica nas taxas de maturação nuclear de oócitos maturados *in vitro*.

Tensão de O ₂ (%)	Suplemento	N	MII (%)	MI (%)	Não Identificados (%)	Degenerados (%)
20 (ar)	SVC	42	72,53±0,12	11,86±0,22	6,98±0,91	8,62±0,86
20 (ar)	PVA	36	74,89±0,20	7,20±0,73	8,14±0,93	9,76±0,77
5	SVC	38	72,39±0,06	6,73±0,72	3,70±1,41	17,7±0,27
5	PVA	35	72,22±0,08	12,22±0,46	10,00±0,86	5,56±0,75

Valores não diferem entre os grupos (Anova; $P>0,05$). Os resultados estão demonstrados em média e erro padrão. SVC (soro de vaca no cio); PVA (álcool polivinílico).

5.2 Avaliação da viabilidade das células do *cumulus* após maturação *in vitro* em meio livre de soro e em baixa tensão de O₂.

Observou-se, mediante avaliação morfológica, que após maturação os oócitos suplementados com SVC em alta (20%) ou em baixa (5%) tensão de O₂ apresentaram uma maior expansão das células do *cumulus* do que os oócitos que receberam PVA (Fotografia 2).



Fotografia 2. Expansão das células do *cumulus* após maturação *in vitro* de oócitos previamente selecionados com mais de três camadas de células e citoplasma homogêneo. Grupos – A: SVC (soro de vaca no cio) em 20% O₂; B: PVA (álcool polivinílico) em 20% O₂; C: SVC em 5% O₂; D: PVA em 5% O₂. Aumento: 40X.

Quando as células do *cumulus* foram submetidas à coloração com o corante Azul de Tripán não foram encontradas diferenças ($P > 0,05$) na viabilidade das células entre os diferentes grupos (Gráfico 3).

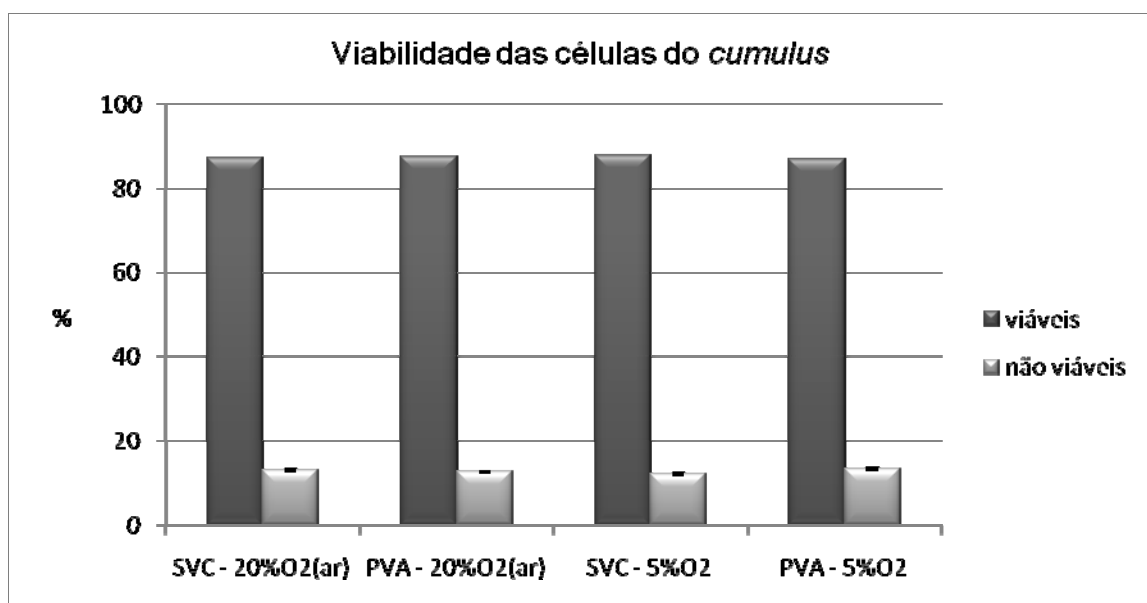


Gráfico 3. Viabilidade das células do *cumulus* após maturação *in vitro* em diferentes condições. Grupos – SVC (soro de vaca no cio) em 20% O₂; PVA (álcool polivinílico) em 20% O₂; SVC em 5% O₂; PVA em 5% O₂. Não houve diferença significativa entre os grupos (Anova; $P > 0,05$).

5.3 Efeito do meio sem soro e baixa tensão de O₂ na maturação *in vitro* de oócitos sobre o desenvolvimento pré-implantacional.

Após fertilização *in vitro* não foram encontradas diferenças significativas ($P>0,05$) nas taxas de clivagem nos diferentes grupos (Tabela 4). Quando os oócitos foram maturados em alta tensão de O₂ (20%), a taxa de produção de blastocistos no D7 e D8 em meio suplementado com SVC foi superior ($P<0,05$) aquele com PVA. Contudo, quando foi avaliada a taxa de blastocistos dos oócitos maturados em baixa tensão de O₂ (5%) não houve diferença entre os meios com ou sem soro ($P>0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4: Efeito dos suplementos e atmosfera de maturação nas taxas de clivagem e produção de embriões bovinos *in vitro*.

Tensão de O ₂ (%)	Suplemento	N	Clivagem (%)	Blastocisto Dia 7 (%)	Blastocisto Dia 8 (%)
20 (ar)	SVC	452	58,9±4,05 ^a	22,7±2,00 ^a	22,2±2,00 ^a
20 (ar)	PVA	470	51,3±4,28 ^a	14,7±1,44 ^b	14,4±1,53 ^b
5	SVC	447	56,7±3,44 ^a	20,6±1,97 ^a	20,3±2,18 ^{ab}
5	PVA	478	55,3±3,52 ^a	18,9±0,99 ^{ab}	19,2±0,99 ^{ab}

^{a,b} Letras diferentes apresentam diferenças significativas entre os grupos (Anova; $P<0,05$). Os resultados estão demonstrados em média e erro padrão. SVC (soro de vaca no cio); PVA (álcool polivinílico).

O Gráfico 4 mostra os dados da qualidade morfológica dos blastocistos provenientes dos quatro grupos de MIV, avaliada no D8. Quando os oócitos foram maturados em alta tensão de O₂ (20%), o grupo suplementado com SVC foi superior ($P<0,05$) ao grupo com PVA, em relação à porcentagem de embriões de Grau 1. Porém, em baixa tensão de O₂ (5%) não houve diferença nos meios suplementados com SVC ou PVA ($P>0,05$). Com relação aos embriões de Grau 2 e Grau 3 não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($P>0,05$).

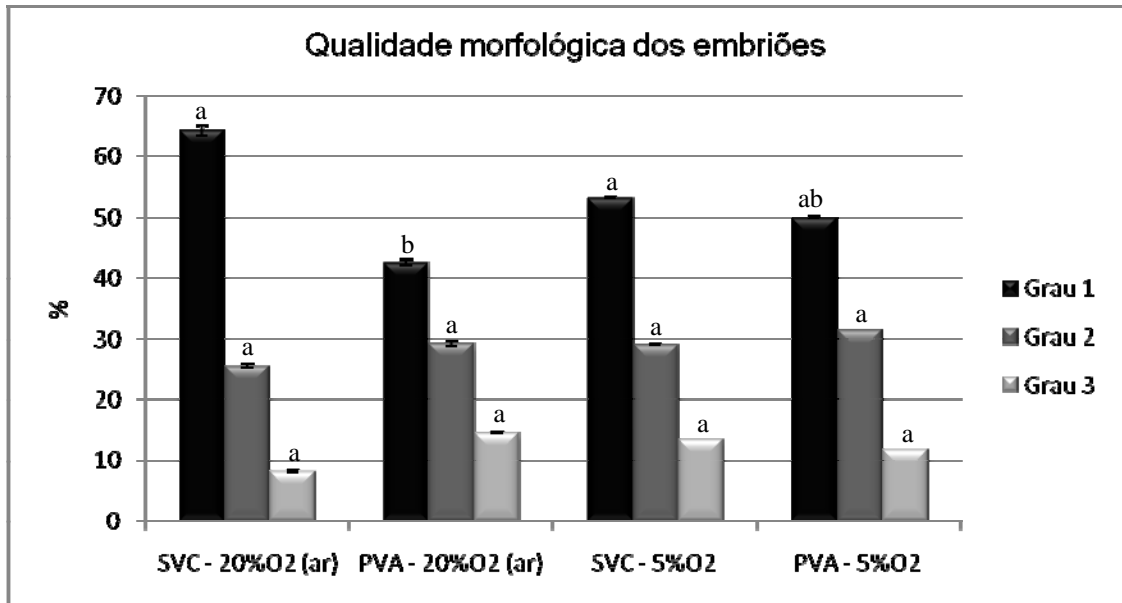
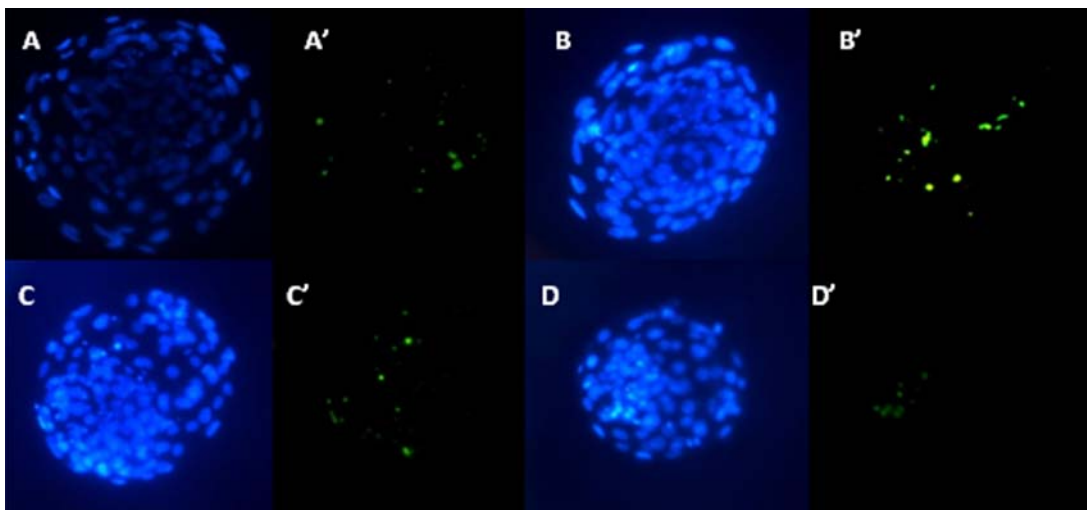


Gráfico 4. Efeito dos suplementos e atmosfera de maturação na qualidade morfológica de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Grupos – SVC (soro de vaca no cio) em 20% O₂; PVA (álcool polivinílico) em 20% O₂; SVC em 5% O₂; PVA em 5% O₂. ^{a,b} Letras diferentes apresentam diferenças significativas entre os grupos (Anova; P<0,05).

Utilizando a técnica de TUNEL foi analisado o número total de células embrionárias, o número de células apoptóticas e índice apoptótico dos embriões oriundos dos diferentes sistemas de MIV. Na Fotografia 5 estão representadas as imagens de blastocistos submetidos à técnica de TUNEL.



Fotografia 5. Detecção da fragmentação do DNA pela técnica de TUNEL em blastocistos bovinos oriundos de diferentes sistemas de maturação *in vitro*. Ilustrações A, B, C e D - Blastocistos com blastômeros marcados pelo DAPI e visualizados em azul no filtro 460nm. Ilustrações A', B', C' e D' - Blastocistos com blastômeros corados pela fluoresceína apresentando coloração verde no filtro 520±20nm, indicando apoptose. Grupos – A/A' (SVC: soro de vaca no cio em 20% O₂); B/B' (PVA: álcool polivinílico em 20% O₂); C/C' (SVC em 5% O₂); D/D' (PVA em 5% O₂) – Aumento: 100X.

Com relação ao número total de células, o grupo de maturação suplementado com PVA em alta tensão de O₂ (20%) originou blastocistos com número de células inferior ($P>0,05$) aos outros três grupos. Quando foi avaliado o número de células apoptóticas o grupo com PVA em baixa tensão de O₂ (5%) apresentou um menor número de células apoptóticas ($P<0,05$) em relação aos outros três grupos que não apresentaram diferenças significativas entre si ($P>0,05$).

O índice apoptótico no grupo com PVA em alta tensão de O₂ (20%) foi maior que nos outros grupos ($P<0,05$). Por outro lado, o grupo de PVA em baixa tensão de O₂ (5%) apresentou o menor índice apoptótico comparado com os outros três grupos ($P<0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5: Efeito dos suplementos e atmosfera de maturação dos oócitos no n° total de células embrionárias, n° de células apoptóticas e índice apoptótico em embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Tensão de O ₂ (%)	Suplemento	N	N° total de Células	N° de células apoptóticas	Índice apoptótico
20 (ar)	SVC	22	116,90±2,60 ^a	20,95±1,29 ^a	0,18±0,011 ^a
20 (ar)	PVA	18	85,77±2,49 ^b	19,50±1,42 ^a	0,22±0,015 ^b
5	SVC	19	112,73±2,87 ^a	21,73±1,29 ^a	0,19±0,009 ^a
5	PVA	18	111,11±2,67 ^a	10,72±1,25 ^b	0,09±0,011 ^c

^{a,b} Letras diferentes apresentam diferenças significativas entre os grupos (Anova; $P<0,05$). Os resultados estão demonstrados em média e erro padrão. SVC (soro de vaca no cio); PVA (álcool polivinílico).

5.4 Quantificação de transcritos armazenados em oócitos bovinos maturados sob diferentes condições *in vitro*

Após a padronização da PCR em tempo real foram obtidas as temperaturas de dissociação (Tabela 6) e eficiência da reação para cada gene avaliado (Tabela 7). Para a análise da quantificação relativa utilizou-se como referencia endógena o gene da β -ACTINA, cujo coeficiente de variação entre as amostras foi o menor (2,35%), quando comparado com o GAPDH (3,48%).

Tabela 6: Quantidade de cDNA, concentração de *primers*, temperatura de pareamento e temperatura de dissociação (TD) dos genes estudados nas condições padronizadas da PCR em tempo real.

Gene	cDNA (ng)	Primer (nM)	Temperatura de pareamento (°C)	Temperatura de dissociação (°C)
PRDX1	600	100	53°C	78,9°C
HSP70.1	600	100	59°C	86,3°C
BAX	600	100	64°C	84,4°C
BCL-2	600	100	53°C	84,5°C
ZAR1	200	400	53°C	81,5°C
MATER	200	400	53°C	84,9°C
HMG1	200	400	53°C	79,5°C
GDF9	200	400	53°C	83,5°C
GAPDH	200	400	53°C	83,7°C
β -ACTINA	200	400	53°C	86,2°C

Tabela 7: Eficiência da reação e coeficiente de correlação (r) para cada gene nas condições padronizadas da PCR em tempo real.

Gene	Eficiência	r
PRDX1	1,91	1
HSP70.1	1,72	1
BAX	1,56	1
BCL-2	1,71	1
ZAR1	1,86	1
MATER	1,94	1
HMG1	1,91	1
GDF9	1,96	1
GAPDH	1,88	1
β -ACTINA	1,87	1

Quando foi avaliada a influência da suplementação com SVC ou PVA em oócitos maturados em alta tensão de O₂ (20%), observou-se uma maior abundância de transcritos ($P < 0,05$) de resposta ao estresse (PRDX1, HSP70.1), apoptose (BCL-2), transição materno-zigótica (ZAR1) e maturação (GDF9) nos oócitos suplementados com PVA (Gráfico 6).

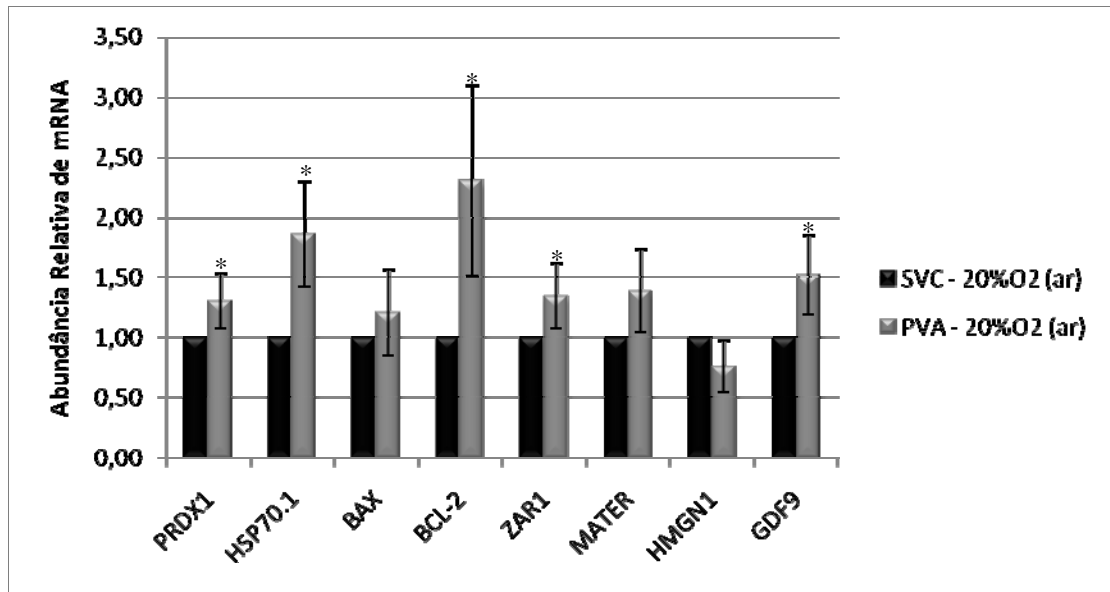


Gráfico 6. Abundância relativa de transcritos relacionados ao estresse celular (PRDX1, HSP70.1), apoptose (BAX e BCL-2), transição materno-zigótica (ZAR1, MATER, HMGN1) e maturação (GDF9) em oócitos bovinos maturados *in vitro* suplementados com SVC (soro de vaca no cio) ou PVA (álcool polivinílico) em 20% de O₂. Os resultados estão demonstrados em média e erro padrão, utilizando-se como calibrador o grupo SVC-20% de O₂ (valor igual a 1). Diferenças significativas entre os grupos são indicados por * P<0,05.

O transcrito de HMGN1 foi sub-regulado (P<0,05) nos oócitos maturados com SVC e PVA em 5% de O₂ comparados com os oócitos suplementados com SVC em 20% de O₂ (Gráficos 7 e 8).

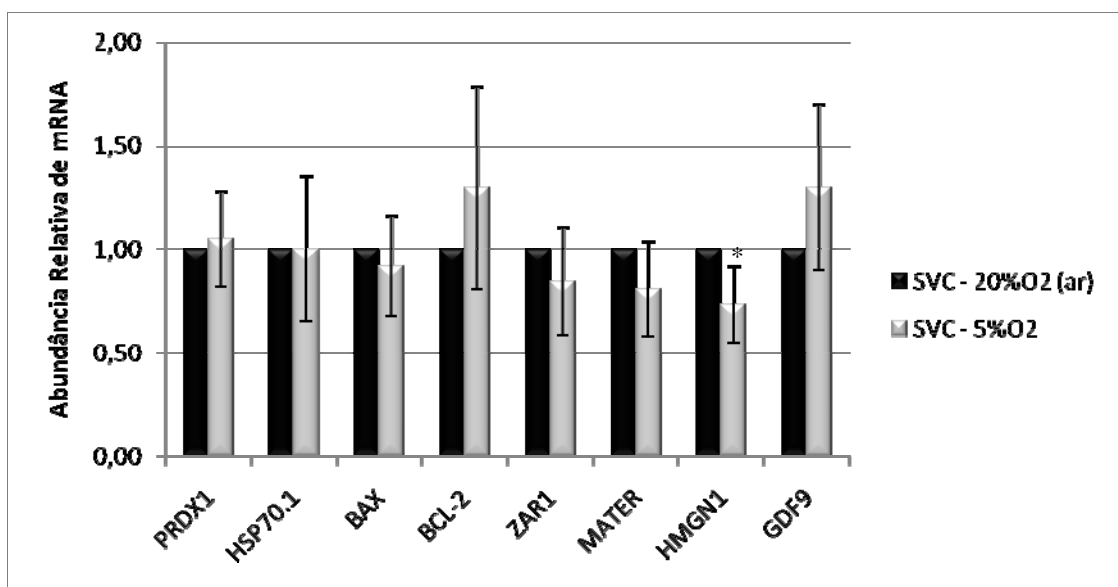


Gráfico 7. Abundância relativa de transcritos relacionados ao estresse celular (PRDX1, HSP70.1), apoptose (BAX e BCL-2), transição materno-zigótica (ZAR1, MATER, HMGN1) e maturação (GDF9) em oócitos bovinos maturados *in vitro* suplementados com SVC (soro de vaca no cio) em 20% ou 5% de O₂. Os resultados estão demonstrados em média e erro padrão, utilizando-se como calibrador o grupo SVC-20% de O₂ (valor igual a 1). Diferenças significativas entre os grupos são indicados por * P<0,05.

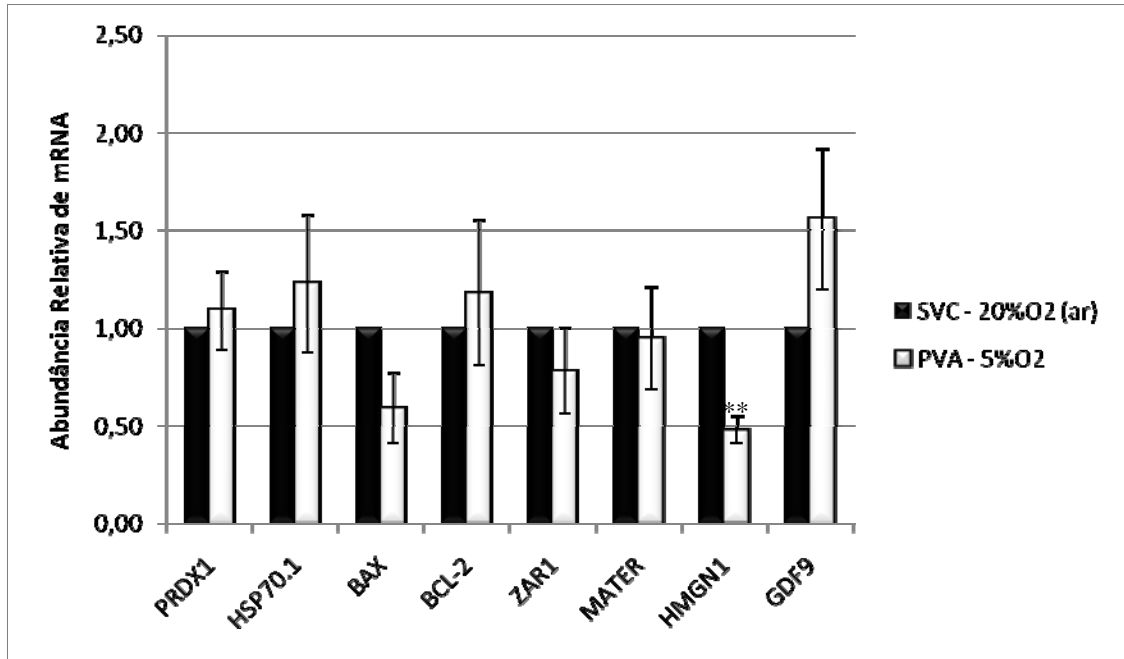


Gráfico 8. Abundância relativa de transcritos relacionados ao estresse celular (PRDX1, HSP70.1), apoptose (BAX e BCL-2), transição materno-zigótica (ZAR1, MATER, HMGN1) e maturação (GDF9) em oócitos bovinos maturados *in vitro* suplementados com SVC (soro de vaca no cio) em 20% ou PVA (álcool polivinílico) em 5% de O₂. Os resultados estão demonstrados em média e erro padrão, utilizando-se como calibrador o grupo SVC-20% de O₂ (valor igual a 1). Diferenças significativas entre os grupos são indicados por ** P<0,001.

As análises das curvas de dissociação dos genes estudados mostraram não haver picos referentes a dímeros de *primers* ou produtos inespecíficos da PCR (Gráficos 9 a 11). A ausência destes picos é uma das condições para validar a quantificação de transcritos por PCR em tempo real, quando se utiliza o corante *Syber Green*, já que este se liga a qualquer dupla fita de DNA podendo levar a uma alteração nos valores de quantificação, e com isso, a um erro de interpretação.

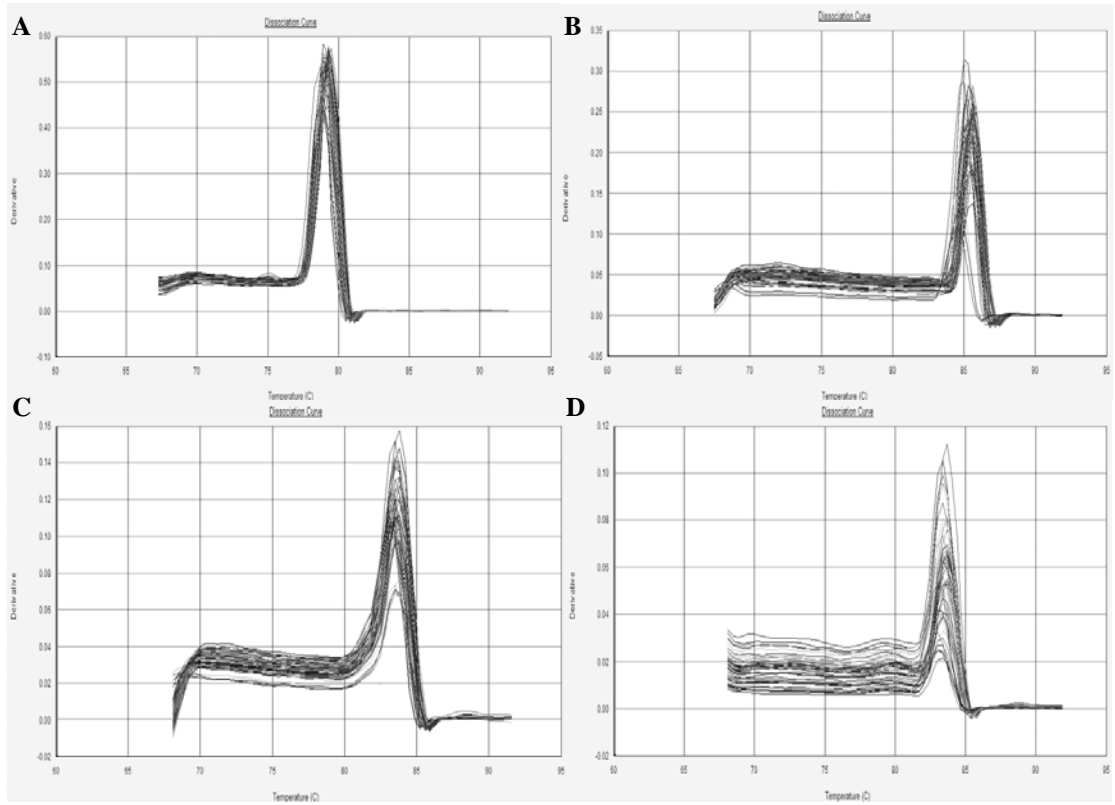


Gráfico 9. Curvas de dissociação dos genes PRDX1 (A), HSP70.1 (B), BAX (C), BCL-2 (D) obtidas após amplificação por PCR em tempo real.

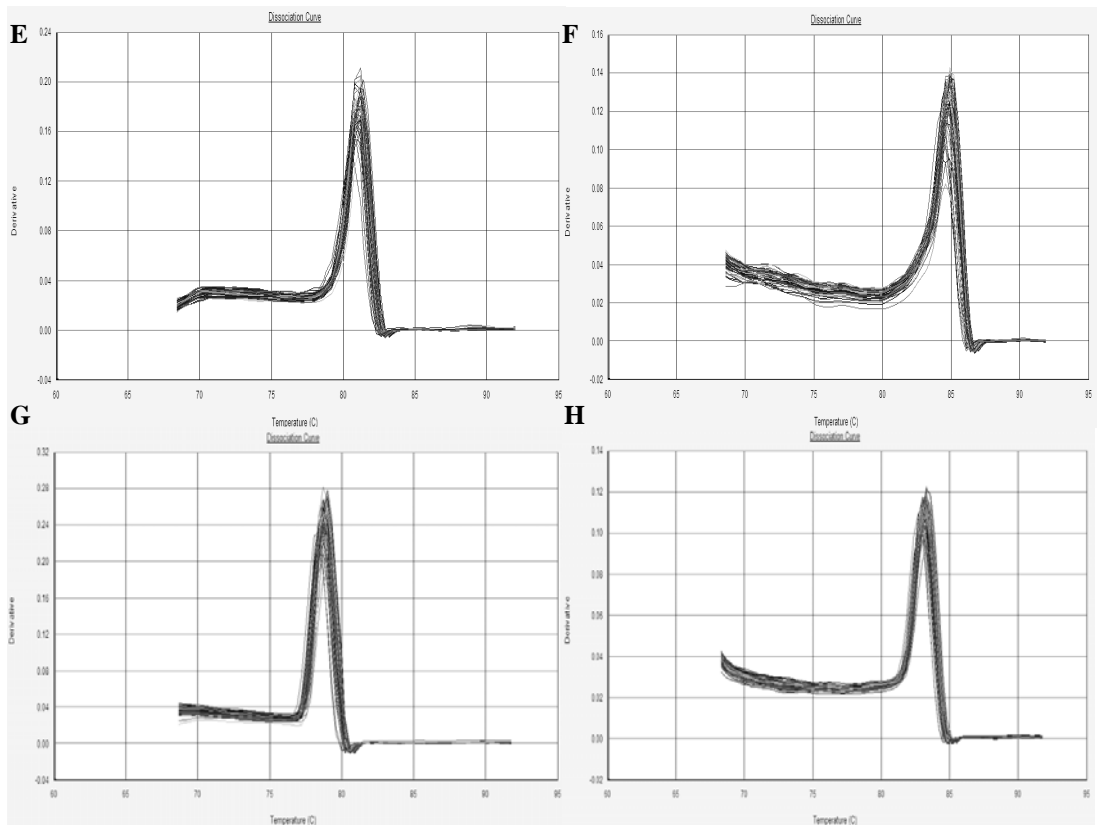


Gráfico 10. Curvas de dissociação do gene ZAR1 (E), MATER (F), HMG1 (G) e GDF9 (H) obtidas após amplificação por PCR em tempo real.

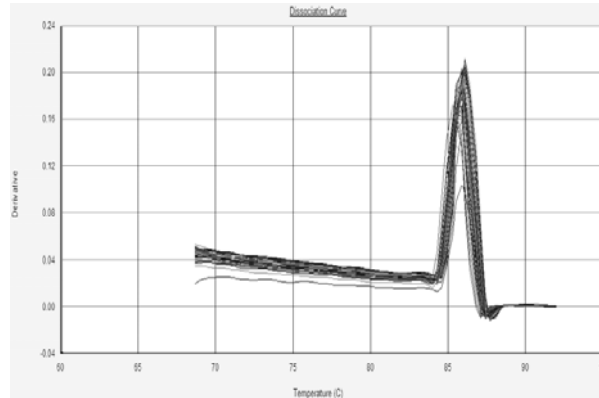
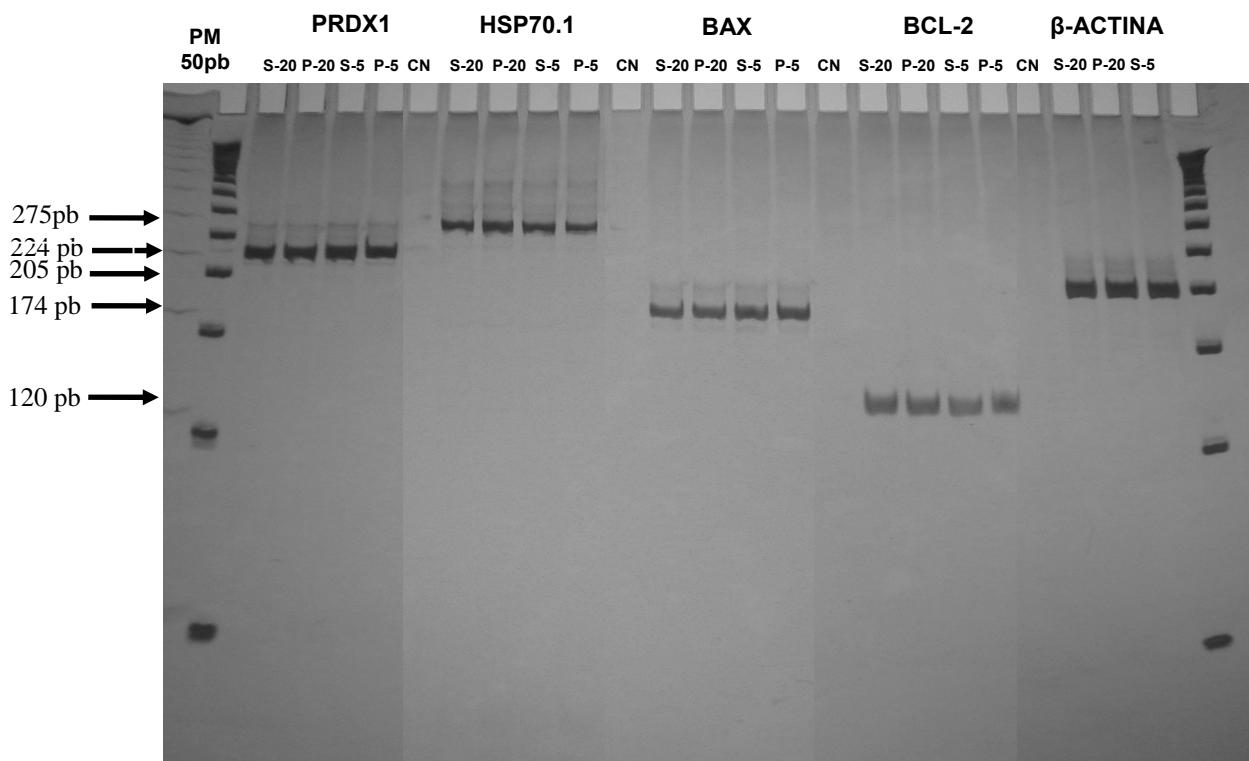
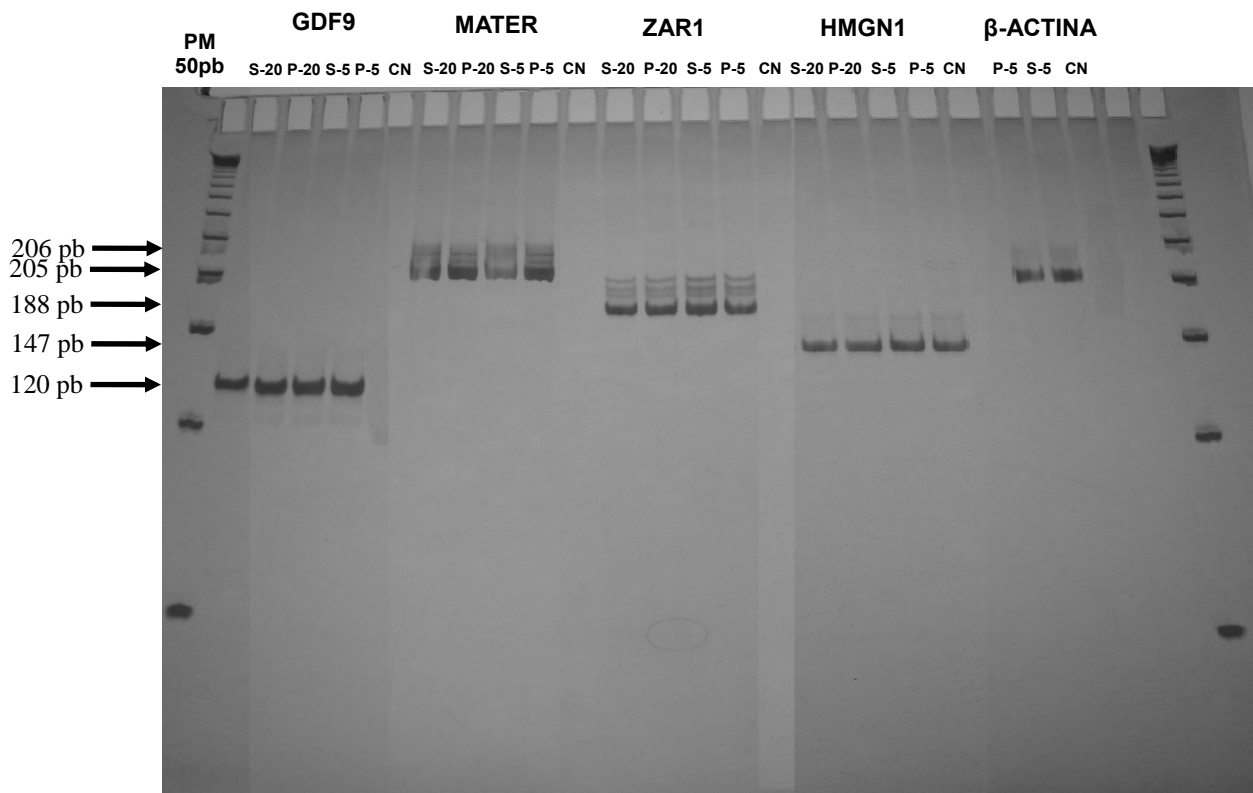


Gráfico 11. Curva de dissociação do gene β -ACTINA obtidas após amplificação por PCR em tempo real.

Além da análise das curvas de dissociação, os produtos da PCR em tempo real também foram submetidos à técnica de eletroforese em gel de poliácridamida para confirmação da presença e tamanho dos produtos e validação dos resultados. Todos os transcritos dos genes estudados foram identificados e apresentaram o tamanho esperado (Fotografias 12 e 13).



Fotografia 12. Gel de poliácridamida mostrando a presença dos transcritos dos genes PRDX1, HSP70.1, BAX, BCL-2 e β -ACTINA em oócitos maturados *in vitro* após PCR em tempo real. S-20 (SVC: soro de vaca no cio em 20%O₂); P-20 (PVA: álcool polivinílico em 20%O₂); S-5 (SVC em 5%O₂); P-5 (PVA em 5%O₂); CN (controle negativo). PM: peso molecular.



Fotografia 13. Gel de poliacrilamida mostrando a presença dos transcritos dos genes GDF9, MATER, ZAR1, HMGN1 e β-ACTINA em oócitos maturados *in vitro* após PCR em tempo real. S-20 (SVC: soro de vaca no cio em 20%O₂); P-20 (PVA: álcool polivinílico em 20%O₂); S-5 (SVC em 5%O₂); P-5 (PVA em 5%O₂); CN (controle negativo). PM: peso molecular.

6 DISCUSSÃO

O soro e a alta tensão de oxigênio durante o cultivo *in vitro* de blastocistos prejudicam o desenvolvimento embrionário e fetal (KRUIP, BEVERSE e KEMP, 2000; GUERIN, MOUATASSIM e MENEZO, 2001; McEVOY, 2003; CALDER *et al.*, 2005). Contudo, pouco se sabe sobre o efeito da interação da suplementação com soro e tensão de O₂ na maturação *in vitro* sobre a competência de desenvolvimento de oócitos bovinos. Dados do presente estudo fornecem evidências que essa interação altera o potencial de desenvolvimento dos oócitos *in vitro*. Oócitos maturados em baixa tensão de O₂ (5%) e em meio sem soro (suplementado com PVA) produziram blastocistos com baixo índice apoptótico quando comparados aos outros sistemas de maturação *in vitro*.

A progressão da meiose até MII não foi afetada pelas combinações de tensão de O₂ (20 ou 5%) e macromoléculas (SVC ou PVA). Nossos resultados corroboram com estudos que não observaram diferenças nas taxas de metáfase I (MI) e MII quando os oócitos foram maturados com PVP40 ou SFB (ALI e SIRARD, 2002; WARZYCH *et al.*, 2007), apesar desses autores não terem avaliado a tensão de O₂. Porém, nossos resultados discordam de Mingoti *et al.* (2009) que encontraram baixas taxas de MII quando os oócitos foram maturados com PVA em 5% de O₂ comparados com SFB ou PVA em 20% de O₂. Esses mesmos autores não encontraram alteração na taxa de blastocistos, além de não terem analisado a qualidade dos embriões produzidos. Algumas diferenças nos meios de maturação entre os estudos podem explicar esses resultados contrastantes. Apesar de ter sido utilizado o meio base TCM 199, o presente experimento empregou somente FSH, enquanto Mingoti *et al.* (2009) adicionou outros hormônios como a gonadotrofina coriônica humana (hCG) e estradiol. Interações entre esses hormônios com diferentes macromoléculas e tensões de O₂ podem ter interferido na meiose.

Os CCOs maturados com SVC tanto em baixa (5%) quanto em alta (20%) tensão de O₂ tiveram maior expansão das células do *cumulus* comparados com os oócitos maturados com PVA. Contudo, a menor expansão dessas células no grupo com PVA em 5% de O₂ não prejudicou o desenvolvimento pós-fertilização. A expansão das células do *cumulus* é mais intensa durante a maturação *in vivo* do que

in vitro (HENDRIKSEN *et al.*, 2000) sendo um processo importante para a FIV. Porém, Ali e Sirard (2002) e Russell *et al.* (2006) observaram que, *in vitro*, a expansão do *cumulus* não é fundamental para a melhora da competência de desenvolvimento do oócito até o estágio de blastocisto.

Após avaliação com Azul de Tripán não foi encontrada diferença na viabilidade das células do *cumulus* entre os grupos. A presença de células do *cumulus* viáveis é importante, pois constitui a ponte entre o oócito e o ambiente *in vitro* (TANGHE *et al.*, 2002). Assim, oócitos com pouca expansão das células do *cumulus*, desde que estas se mantenham viáveis, não prejudica o desenvolvimento embrionário. Apesar do transcrito de GDF9 estar mais abundante nos oócitos maturados com PVA e em 20% de O₂, este fato não aumentou a expansão das células do *cumulus* quando comparado aos oócitos que receberam soro. Fatores presentes no soro estimulam a expansão das células do *cumulus in vitro* (SENBON *et al.*, 2004) assim como a proteína de GDF9 secretada pelo oócito no ambiente de maturação (SHIMASAKI *et al.*, 2003). Portanto, é provável que na ausência de soro e na presença de alta tensão de oxigênio seja necessário uma maior produção de GDF9 por parte do oócito visando à expansão, mesmo que parcial, das células do *cumulus*, possivelmente para suprir a deficiência de fatores que seriam fornecidos pelo soro.

Em alta tensão de O₂ (20%), os oócitos maturados com SVC produziram maior taxa de blastocitos, embriões de grau 1 e número total de células, porém, embriões com baixo índice apoptótico quando comparado com PVA. O soro tem ação antioxidativa em meios de CIV (BAVISTER, 1995; ALI, BILODEAU e SIRARD, 2003) e podem proteger os oócitos contra a produção de ROS em alta tensão de oxigênio (ZHANG *et al.*, 2006; TAMURA *et al.*, 2008). Desta forma, é possível que em ambiente com 20% de O₂, o soro tenha favorecido o desenvolvimento dos oócitos. Por outro lado, os oócitos maturados com PVA e 20% de O₂ produziram blastocistos com alto índice apoptótico quando comparado com os outros grupos. Provavelmente, esse sistema de maturação pode ter causado danos ao DNA ou distúrbios a componentes citoplasmáticos que atuam no reparo do DNA. Zheng *et al.* (2005) observaram que alterações na expressão de fatores maternos que atuam no reparo do DNA em oócitos podem afetar o desenvolvimento pré-implantacional. Esses autores, também observaram que os sistemas de cultivo *in vitro* podem levar a falha na regulação de genes importantes de reparo do DNA. Danos ao DNA, RNA

e proteínas contidos no oócito podem determinar se o embrião irá se desenvolver até o estágio de blastocisto (BAUMANN *et al.*, 2007). Além disso, lesões ao DNA podem interromper o ciclo celular, levando a morte da célula por apoptose (YOSHIDA e MIKI, 2004). Desta forma, apesar dos oócitos possuírem enzimas antioxidantes, a elevada tensão de O₂ associada ao meio sem soro pode ter prejudicado a integridade do DNA, resultando em blastocistos com mais células apoptóticas.

O sistema de maturação *in vitro* com PVA e baixa tensão de oxigênio (5%) resultou em taxas de blastocistos semelhantes às outras combinações de macromoléculas e tensões de O₂. Todavia, os oócitos maturados nessa condição produziram blastocistos com baixo índice apoptótico. Como discutido acima, isto pode ter ocorrido devido a melhores condições de maturação *in vitro*, resultando em menor estresse oxidativo e, conseqüentemente, poucos danos ao DNA. Assim, mesmo o soro tendo ação anti-oxidativa, sua presença pode ser suprimida em sistemas de maturação *in vitro* que utilizem baixa tensão de O₂. Isto é interessante, visto que o soro pode ser fonte de variação na produção de embriões (RIZOS *et al.*, 2003; CALDER *et al.*, 2005; LIM *et al.*, 2007; WRENZYCKI, HERRMAN e NIEMMAN, 2007) e conter substâncias tóxicas que podem reduzir a viabilidade celular (BYRNE *et al.*, 1999; KRISHER, LANE e BAVISTER, 1999; ABE e HOSHI, 2003). Essa ação nociva do soro pode justificar o alto índice apoptótico em blastocistos oriundos de oócitos maturados com SVC em 5% de O₂ quando comparado com PVA nas mesmas condições de oxigênio.

Foram encontrados mais blastocistos de grau 1 a partir de oócitos maturados com SVC em 20% de O₂ que de oócitos maturados com PVA e 5% de O₂. Entretanto, mais células apoptóticas foram encontradas em blastocistos derivados de oócitos maturados com SVC em 20% de O₂. Estes resultados estão de acordo com um trabalho desenvolvido em embriões humanos, onde não foi encontrada relação entre o grau de qualidade morfológica, observada visualmente, dos blastocistos e danos ao DNA (STURMEY *et al.*, 2009). Embriões produzidos *in vitro* com elevada degradação do DNA, geralmente, degeneram-se (JURISICOVA, VARMUZA e CASPER, 1996; ANTUNES *et al.*, 2008). Porém, esta degeneração, nos seus estádios iniciais, pode não ser morfológicamente identificada sobre estereomicroscópio, prejudicando a classificação visual dos embriões. Desta forma,

a classificação morfológica dos blastocistos pode não estar associada com a integridade do DNA e índice apoptótico em embriões bovinos.

Oócitos maturados com PVA em 20% de O₂ apresentaram maior quantidade de transcritos relacionados com estresse oxidativo (HSP70.1 e PRDX1) e com mecanismos anti-apoptóticos (BCL-2). No cultivo embrionário, um dos efeitos da elevada tensão de oxigênio é a maior formação de radicais livres (BAVISTER, 1995; GUERIN, MOUATASSIM e MENEZO, 2001) e que podem interferir na expressão de genes (RINAUDO *et al.*, 2006; CORREA *et al.*, 2008). O estresse oxidativo causa um aumento nos níveis de HSP70.1 em embriões cultivados *in vitro* (BETTS e KING, 2001; CHRISTIANS *et al.*, 2003). Eritrócitos de camundongos nocautes para o gene de PRDX1 apresentaram mais danos ao DNA causados pelo estresse oxidativo do que eritrócitos de camundongos selvagens (NEUMANN *et al.*, 2003). O estresse oxidativo induz a apoptose (BETTS e KING, 2001; STONE e YANG, 2006), enquanto o gene BCL-2 tem ação anti-apoptótica produzindo uma proteína que pode se ligar a proteína do gene BAX prevenindo a liberação do citocromo C da mitocôndria após estímulo apoptótico (VAN DELFT e HUANG, 2006). Células tratadas com H₂O₂ tiveram alta expressão de proteínas BCL-2 (CHEN, LIU e MERRETT, 2000) que também atuam na redução dos níveis de ROS (SUSNOW *et al.*, 2009). Portanto, é provável que quantidades elevadas dos transcritos de HSP70.1, PRDX1 e BCL-2 nos oócitos maturados com PVA em 20% O₂ seja necessário para minimizar o estresse oxidativo nessas condições de maturação *in vitro*.

Oócitos maturados com PVA em 20% de O₂ também apresentaram alta abundância do transcrito de ZAR1, mas baixa taxa de blastocistos e número de células embrionárias quando comparados com oócitos maturados com SVC. ZAR1 é um gene de efeito materno que atua na TMZ (WU *et al.*, 2003; BEBBERE *et al.*, 2008), porém, Mota *et al.* (2009) sugerem que alterações nos níveis de expressão de ZAR1 em oócitos bovinos pode não estar associadas à competência de desenvolvimento. Nossos resultados com PCR em tempo real reforçam essa idéia, uma vez que, a elevada quantidade de transcritos de ZAR1 não ocasionou melhora na competência de desenvolvimento dos oócitos, avaliada pelas taxas de produção de blastocistos e número total de células embrionárias.

Blastocistos derivados de oócitos maturados em 5% de O₂ com SVC ou PVA exibiram baixa abundancia dos transcritos de HMG1 quando comparado com oócitos maturados com SVC em 20% O₂. Porém, a produção de blastocitos nesses

grupos não foi comprometida. HMGN1 é uma proteína cromossomal não histônica que se liga ao nucleossomo, reduzindo a compactação da cromatina favorecendo a transcrição (WEST, 2004). Contudo, o transcrito de HMGN1 parece regular poucos genes. Fibroblastos de camundongos nocautes para o gene de HMGN1 apresentaram expressão alterada de 4 do total de 12 genes avaliados (LIM *et al.*, 2004), sendo necessários outros estudos avaliando um número maior de genes para confirmar essa hipótese. Furusawa *et al.* (2006) sugerem que o transcrito de HMGN2 pode compensar a ausência de HMGN1. Desta forma, é possível que os transcritos maternos para HMGN1 podem ter pouca influência na competência de desenvolvimento de oócitos maturados *in vitro*.

O transcrito de MATER não apresentou alterações nos diferentes sistemas de maturação *in vitro*. Em camundongos, os transcritos maternos para MATER parecem ter efeito importante na ativação do genoma embrionário (TONG *et al.*, 2000). Porém, o papel desse gene ainda não está totalmente esclarecido (BEBBERE *et al.*, 2008), sendo necessária a realização de mais estudos que possam contribuir para o entendimento de sua função em oócitos e embriões bovinos.

7 CONCLUSÃO

- A maturação com PVA em 5% O₂ fornece um eficiente ambiente de maturação *in vitro* para os oócitos produzindo blastocitos com baixo índice apoptótico;
- A presença de soro durante a maturação *in vitro* é importante para o desenvolvimento embrionário quando os oócitos são maturados em 20% de O₂;
- A classificação morfológica realizada visualmente nos blastocistos não representa um bom indicador de qualidade em relação aos índices de apoptose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H.; HOSHI, H. 2003. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. **Journal of Reproduction and Development**, **49 (3)**: 193-202.

ADAM, A.A.G.; TAKAHASHI, Y.; KATAGIRI, S.; NAGANO, M. 2004. Effects of tension in the gas atmosphere during in vitro maturation, in vitro fertilization and in vitro culture on the efficiency of in vitro production of mouse embryos. **Japanese Journal of Veterinary Research**, **52 (2)**: 77-84.

AITKEN, R.J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. 1993. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, **98 (1)**: 257-265.

ALI, A.; SIRARD, M.A. 2002. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. **Biology of Reproduction**, **66**: 901-905.

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

AL-KATANANI, Y.M.; HANSEN, P.J. 2002. Induced thermotolerance in bovine two-cell embryos and the role of heat shock protein 70 in embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, **62**: 174-180.

ANDRABI, S.M.H.; MAXWELL, W.M.C. 2007. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, **99**: 223-243.

ANTUNES, G.; CHAVEIRO, A.; SANTOS, P.; MARQUES, A.; JIN, H.S.; SILVA, F.M.

2008. Influence of apoptosis in bovine embryo's development. **Reproduction in Domestic Animals, 22:** 1-7.

ASSOU, S.; ANAHORY, T.; PANTESCO, V.; LE CARROUR, T.; PELLESTOR, F.; KLEIN, B.; REYFTMANN, L.; DECHAUD, H.; DE VOS, J.; HAMAMAH, S. 2006. The human cumulus–oocyte-complex gene-expression profile. **Human Reproduction, 21:** 1705-1719.

BANWELL, K.M.; LANE, M.; RUSSELL, D.L.; KIND, K.L.; THOMPSON, J.G. 2007. Oxygen concentration during mouse oocyte *in vitro* maturation affects embryo and fetal development. **Human Reproduction, 22 (10):** 2768-2775.

BAUMANN, C.G.; MORRIS, D.G.; SREENAN, J.M.; LEESE, H.J. 2007. The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability. **Molecular Reproduction and Development, 74:** 1345-1353.

BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: Facts and artifacts. 1995. **Human Reproduction Update, 1 (2):** 91-148.

BEBBERE, D.; BOGLIOLO, L.; ARIU, F.; FOIS, S.; LEONI, G.G.; TORE, S.; SUCCU, S.; BERLINGUER, F.; NAITANA, S.; LEDDA, S. 2008. Expression pattern of zygote arrest 1 (*ZAR1*), maternal antigen that embryo requires (*MATER*), growth differentiation factor 9 (*GDF9*) and bone morphogenetic protein 15 (*BMP15*) genes in ovine oocytes and *in vitro*-produced preimplantation embryos. **Reproduction, Fertility and Development, 20:** 908-915.

BETTS, D.H.; KING, W.A. 2001. Genetic regulation of embryo death and senescence. **Theriogenology, 55 (1):** 171-191.

BETTEGOWDA, A.; PATEL, O.V.; IRELAND, J.J.; SMITH, G.W. 2006. Quantitative analysis of messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, cyclophilin-A, phosphoglycerokinase, beta-glucuronidase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, beta-actin, and histone H2a during bovine oocyte maturation and early embryogenesis *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development, 73 (3):**

267-278.

BETTEGOWDA, A.; PATEL, O.V.; LEE, K.; PARK, K.; SALEM, M.; YAO, J.; IRELAND, J.J.; SMITH, G.W. 2008. Identification of novel bovine cumulus cell molecular markers predictive of oocyte competence: functional and diagnostic implications. **BMC Biology of Reproduction**, **79**: 301-309.

BYRNE, A.T.; SOUTHGATE, J.; BRISON, D.R.; LEESE, H.J. 1999. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **Journal of Reproduction and Fertility**, **117**: 97–105.

BOEDIONO, A.; SUZUKI, T.; GODKE, R.A. 2003. Comparison of hybrid and purebred *in vitro*-derived cattle embryos during *in vitro* culture. **Animal Reproduction Science**, **78**: 1-11.

BOOTH, P.J.; HOLM, P.; CALLESEN, H. 2005. The effect of oxygen tension on porcine embryonic development is dependent on embryo type. **Theriogenology**, **63**: 2040-2052.

BREVINI, T.A.; CILLO, F.; COLLEONI, S.; LAZZARI, G.; GALLI, C.; GANDOLFI, F. 2004. Expression pattern of the maternal factor zygote arrest 1 (Zar1) in bovine tissues, oocytes and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, **69**: 375-380.

BREVINI, T.A.; CILLO, F.; ANTONINI, S.; TOSETTI, V.; GANDOLFI, F. 2007. Temporal and spatial control of gene expression in early embryos of farm animals. **Reproduction, Fertility and Development**, **19**: 35-42.

BUSTIN, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, **25**: 169-193.

CALDER, M.D.; CAVENEY, N.A.; SIRARD, M.A.; WATSON, A.J. 2005. Effect of serum and cumulus cell expansion on marker gene transcripts in bovine cumulus-

oocyte complexes during maturation in vitro. **Fertility and Sterility**, **83**: 1077-1085.

CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; RAMOS, A.A.; VALE FILHO, V.R. 2006. Factors influencing in vitro embryo production. **Animal Reproduction**, **3**: 19-28.

CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; RAMOS, A.A.; SERAPIAO, R.V.; SA, W.F.; FERREIRA, A.M.; GUIMARAES, M.F.M.; VALE FILHO, V.R. 2007. Developmental competence and expression of the Hsp70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. **Theriogenology**, **68**: 626-632.

CECCONI, S.; BARBONI, B.; COCCIA, M.; MATTIOLI, M. 1999. In vitro development of sheep preantral follicles. **Biology of Reproduction**, **60 (3)**: 594-601.

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

CHEN, Q.M.; LIU, J.; MERRETT, J.B. 2000. Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and Bax in H₂O₂ response of normal human fibroblasts. **Biochemical Journal**, **347**: 543-551.

CHRISTIANS, E.S.; ZHOU, Q.; RENARD, J.; BENJAMIN, I.J. 2003. Heat shock proteins in mammalian development. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, **14**: 283-290.

CHAND, A.L.; PONNAMPALAM, A.P.; HARRIS, S.E; WINSHIP, I.M.; SHELLING, A.N. 2006. Mutational analysis of BMP15 and GDF9 as candidate genes for premature ovarian failure. **Fertility and Sterility**, **86 (4)**: 1009-1012.

DE LA FUENTE, R.; EPPIG, J.J. 2001. Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin

remodeling. **Developmental Biology**, **229 (1)**: 224-236.

DIELEMAN, S.J.; HENDRIKSEN, P.J.; VIUFF, D.; THOMSEN, P.D.; HYTTEL, P.; KNIJN, H.M.; WRENZYCKI, C.; KRUIP, T.A.; NIEMANN, H.; GADELLA, B.M.; BEVERS, M.M.; VOS, P.L. 2002. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, **57**: 5-20.

DONG, J.W.; ALBERTINI, D.F.; NISHIMORI, K.; KUMAR, T.R.; LU, N.F.; MATZUK, M.M. 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, **383**: 531-535.

EICHENLAUB-RITTER, U.; PESCHKE, M. 2002. Expression in-vivo and in-vitro growing and maturing oocytes: focus on regulation of expression at the translational level. **Human Reproduction Update**, **8 (1)**: 21-41.

EPPIG, J.J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, **122 (6)**: 829-838.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. 1995. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development**, **4**: 437-442.

FAIR, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, **78**: 203-216.

FAIR T.; CARTER, F.; PARK, S.; EVANS, A.; LONERGAN, P. 2007. Global gene expression analysis during bovine oocyte in vitro maturation. **Theriogenology**, **68**: 591-597.

FARIN, P.W.; CROSIER, A.E.; FARIN, C.E. 2001. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, **55**: 151-170.

FAVETTA, L.A.; JOHN, E.J.; KING, W.A.; BETTS, D.H. 2007. High levels of p66shc

and intracellular ROS in permanently arrested early embryos. **Free Radical Biology & Medicine**, **42**: 1201– 1210.

FULOP, C.; SZANTO, S.; MUKHOPADHYAY, D.; BARDOS, T.; KAMATH, R.V.; RUGG, M.S.; DAY, A.J.; SALUSTRI, A.; HASCALL, V.C.; GLANT, T.T.; MIKECZ, K. 2003. Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced protein-6 deficient mice. **Development**, **130**: 2253-2261.

FURUSAWA, T.; LIM, J.H.; CATEZ, F.; BIRGER, Y.; MACKEM, S.; BUSTIN, M. 2006. Down-Regulation of nucleosomal binding protein HMGN1 expression during embryogenesis modulates Sox9 expression in chondrocytes. **Molecular and Cellular Biology**, **26 (2)**: 592–604

GARDNER, D.K. 1994. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. **Cell Biology International**, **18 (12)**: 1163-1179.

GALLI, C.; LAZZARI, G. 2008. The manipulation of gametes and embryos in farm animals. **Reproduction in Domestic Animals**, **43**: 1-7.

GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. 2007. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, **67**: 6-15.

GJØRRET, J.O.; KNIJN, H.M.; DIELEMAN, S.J.; AVERY, B.; LARSSON, L.; MADDOX-HYTTEL, P. 2003. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo and in vitro. **Biology of Reproduction**, **69**: 1193-1200.

GORDON, Ian. **Laboratory production of cattle embryos**. 2. ed. CAB International. Cambridge University Press: London, 2004.

GUERIN, P.; MOUATASSIM, S.E.; MENEZO, Y. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, **7**: 175-189.

HANSEL, W. 2003. The potential for improving the growth and development of cultured farm animal oocytes. **Animal Reproduction Science**, **79**: 191-201.

HASHIMOTO, S.; MINAMI, N.; TAKAKURA, R.; YAMADA, M.; IMAI, H.; KASHIMA, N. 2000. Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. **Molecular Reproduction and Development**, **57**: 353-360.

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

HIRAO, Y.; ITOH, T.; SHIMIZU, M.; IGA, K.; AOYAGE, K.; KOBAYASHI, M.; KACCH, I.M.; HOSHI, H.; TAKENOUCI, M. 2004. In vitro growth and development of bovine oocyte-granulosa cell complexes on the flat substratum: effects of high polyvinylpyrrolidone concentration in culture medium. **Biology of Reproduction**, **70**: 83-91.

HUMBLOT, P.; HOLM, P.; LONERGAN, P.; WRENZYCKI, C.; LEQUARRE, A.S.; JOLY, C.G.; HERRMANN, D.; LOPES, A.; RIZOS, D.; NIEMANN, H.; CALLESEN, H. 2005. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, **63**: 1149-1166.

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

JAVED, M.H.; WRIGHT, R.W.J.R. 1991. Determination of pentose phosphate and Embden-Meyerhof pathway activities in bovine embryos. **Theriogenology**, **35 (5)**: 1029-1037.

JEWGENOW, K.; PENFOLD, L.M.; MEYER, H.H.; WILDT, D.E. 1998. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. **Journal of Reproduction and Fertility**, **112 (1)**: 39-47.

JOHNSON, M.H.; NASR-ESFAHANI, M.H. 1994. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? **Bioessays**, **16 (1)**: 31-38.

JOHNSON, T.R.; STONE, K.; NIKRAD, M.; YEH, T.; ZONG, W.; THOMPSON, C.B.; NESTEROV, A.; KRAFT, A.S. 2003. The proteasome inhibitor PS-341 overcomes TRAIL resistance in Bax and caspase 9-negative or Bcl-xL overexpressing cells. **Oncogene**, **22**: 4953–4963.

JURISICOVA, A.; VARMUZA, S.; CASPER, R.F. 1996. Programmed cell death and human embryo fragmentation. **Molecular Human Reproduction**, **2 (2)**: 93-98.

KATZ-JAFFE, M.G.; MCCALLIE, B.R.; PREIS, K.A.; FILIPOVITS, J.; GARDNER, D.K. 2009. Transcriptome analysis of in vivo and in vitro matured bovine MII oocytes. **Theriogenology**, **71**: 939–946.

KERR, D.A.; LARSEN, T.; COOK, S.H.; FANNJIANG, Y.R.; CHOI E.; GRIFFIN, D.E.; HARDWICK, J.M.; IRANI, D.N. 2002. BCL-2 and BAX protect adult mice from lethal sindbis virus infection but do not protect spinal cord motor neurons or prevent paralysis. **Journal of Virology**, **76 (20)**: 10393-10400.

KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. 2000. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. **Biology of Reproduction**, **62**: 313-326.

KIDSON, A.; RUBIO-POMAR, F.J.; VAN KNEGSEL, A.; VAN TOL, H.T.A.; HAZELEGER, W.; DUCRO-STEVERINK, D.W.B.; COLENBRANDER, B.; DIELEMAN, S.J.; BEVERS, M.M. 2004. Quality of porcine blastocysts produced in vitro in the presence or absence of GH. **Reproduction**, **127**: 165-177.

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

KLEIN, D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and

limitations. **Trends in Molecular Medicine**, **8**: 257-260.

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

KRISHER, R.L. 2004. The effect of oocyte quality on development. **Journal Animal Science**, **82**: 14-23.

KRUIP, T.A.M.; BEVERSE N.M.; KEMP, B. 2000. Environment of oocyte and embryo determines health of IVP offspring. **Theriogenology**, **53**: 611-618.

LECHNIAK, D. 2002. Quantitative aspect of gene expression analysis in mammalian oocytes and embryos. **Reproductive Biology**, **2 (3)**: 229-241.

LEONI, G.G.; BEBBERE, D.; SUCCU, S.; BERLINGUER, F.; MOSSA, F.; GALIOTO, M.; BOGLIOLO, L.; LEDDA, S.; NAITANA, S. 2007. Relations between relative mRNA abundance and developmental competence of ovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, **74**: 249-257.

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

LEYENS, G.; KNOOPS, B; DONNAY, I. 2004. Expression of peroxiredoxins in bovine oocytes and embryos produced in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, **69**: 243-251.

LIM, J.H.; CATEZ, F.; BIRGER, Y.; WEST, K.L.; PRYMAKOWSKA-BOSAK, M.; POSTNIKOV, Y.V.; BUSTIN, M. 2004. Chromosomal Protein HMG1 Modulates Histone H3 Phosphorylation. **Molecular Cell**, **15**: 573–584.

LIM, K.T.; JANG, G.; KO, K.H.; LEE, W.W.; PARK, H.J.; KIM, J.J.; LEE, S.H.;

HWANG, W.S.; LEE, B.C.; KANG, S.K. 2007. Improved in vitro bovine embryo development and increase efficiency in producing viable calves using defined media. **Theriogenology**, **67**: 293-302.

LONERGAN, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; RIZOS, D.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.M.; BOLAND, P. 2003a. Relative messenger RNA abundance in bovine oocytes collected in vitro or in vivo before and 20 hr after the preovulatory luteinizing hormone surge. **Molecular Reproduction and Development**, **66**: 297–305.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M.P. 2003b. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction in Domestic Animals**, **38 (4)**: 259-267.

LONERGAN, P.; FAIR, T. 2008. In vitro-produced bovine embryos - Dealing with the warts. **Theriogenology**, **69**: 17-22.

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

McEVOY, T.G. 2003. Manipulation of domestic animal embryos and implications for development. **Reproduction in Domestic Animals**, **38**: 268-275.

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

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

MINGOTI, G.Z.; CAIADO, C.V.S.D.; MEO, S.C.; BARRETTO, L.S.S.; GARCIA, J.M. 2009. The effect of interaction between macromolecule supplement and oxygen

tension on bovine oocytes and embryos cultured *in vitro*. **Zygote**, **17**: 321-328.

MIZUSHIMA, S.; FUKUI, Y. 2000. Fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined maturation medium. **Theriogenology**, **55**: 1431-1445.

MOTA, G.B.; BATISTA, R.I.T.P.; SERAPIAO, R.V.; BOITE, M.C.; VIANA, J.H.M.; TORRES, C.A.A.; CAMARGO, L.S.A. 2009. Developmental competence and expression of the MATER and ZAR1 gene in immature bovine oocytes selected by Brilliant Cresyl Blue. **Zygote**, **26**: 1-8.

MOUROT, M.; DUFORT, I.; GRAVEL, C.; ALGRIANY, O.; DIELEMAN, S.; SIRARD, M.A. 2006. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. **Molecular Reproduction and Development**, **73**:1367-1379.

NEUMANN, C.A.; KRAUSE, D.S.; CARMAN, C.V.; DAS, S.; DUBEY, D.P.; ABRAHAM, J.L.; BRONSON, R.T.; FUJIWARA, Y.; ORKIN, S.H.; VAN ETTEN, R.A.; 2003. Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. **Nature**, **424**: 561-565

NIESSING, D.; BLANKE, S.; JACKLE, H. 2002. Bicoid associates with the 5-cap-bound complex of caudal mRNA and represses translation. **Genes Development**, **16**: 2576–2582.

OYAMADA, T.; FUKU, Y. 2004. Oxygen tension and medium supplements for *in vitro* maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. **Journal of Reproduction and Development**, **50 (1)**: 107-17.

PARK, J.I.; HONG, J.Y.; YONG H.Y.; HWANG, W.S.; LIM, J.M.; LEE, E.S. 2005. High oxygen tension during *in vitro* oocyte maturation improves *in vitro* development of porcine oocytes after fertilization. **Animal Reproduction Science**, **87**: 133–141.

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. 1995. Effect of bovine

sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, **44**: 859-869.

PENNETIER, S.; UZBEKOVA, S.; PERREAU, C.; PAPILLIER, P.; MERMILLOD, P.; DALBIES-TRAN, R. 2004. Spatio-temporal expression of the germ cell marker genes MATER, ZAR1, GDF9, BMP15, and VASA in adult bovine tissues, oocytes, and preimplantation embryos. **BMC Biology Reproduction**, **71**: 1359-1366.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, **30 (9)**: 26-36.

PICCIONI, F.; ZAPPAVIGNA, V.A.; VERROTTI, C. 2005. Translational regulation during oogenesis and early development: The cappoly(A) tail relationship. **Comptes Rendus Biologies**, **328**: 863-881.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.; MOORMAN, A.F. 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, **339**: 62-66.

RENSIS, F.D.; SCARAMUZZI, R.J. 2003. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow-a review. **Theriogenology**, **60**: 1139-1151.

RINAUDO, P.F.; GIRITHARAN, G.; TALBI, S.; DOBSON, A.T.; SCHULTZ, R.M. 2006. Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos. **Fertility and Sterility**, **86**: 1252-1265.

RIZOS, D.; LONERGAN, P.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P. 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, **61**: 234-248.

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. 2003. Bovine embryo culture in the presence or

absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biology of Reproduction**, **68**: 236-243.

ROTH, Z.; HANSEN, P.J. 2004. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. **Biology of Reproduction**, **71**: 1898-1906.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in Molecular Biology**, **132**: 365-386.

RUSSELL, D.F.; BAQIR, S.; BORDIGNON, J.; BETTS, D.H. 2006. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, **73**: 1255–1270.

SAGIRKAYA, H.; MISIRLIOGLU, M.; KAYA, A.; FIRST, N.L.; PARRISH, J.J.; MEMILI, E. 2007. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. **Animal Reproduction Science**, **101 (3)**: 225-240.

SARASTE, A.; PULKKI, K. 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, **45**: 528-37.

SENBON, S.; FUKUMI, Y.; HAMAWAKI, A.; YOSHIKAWA, M.; MIYANO, T. 2004. Bovine oocytes grown in serum-free medium acquire fertilization competence. **Journal Reproduction and Developmental**, **50 (5)**: 541-547.

SCHIER, A.F. 2007. The maternal-zygotic transition: Death and birth of RNAs. **Science**, **316**: 406-407.

SCHULTZ, R.M. 2002. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. **Human Reproduction Update**, **8**: 323-331.

SHIMASAKI, S.; MOORE, R.K.; ERICKSON, G.F.; OTSUKA, F. 2003. The role of bone morphogenetic proteins in ovarian function. **Reproduction**, **61**: 323-337.

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

STITZEL, M.L.; SEYDOUX, G. 2007. Regulation of the oocyte-to-zigote transition. **Science**, **316**: 407-408.

STONE, J.R.; YANG, S. 2006. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. **Antioxidants & Redox Signaling**, **8 (3)**: 243-270

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. 1998. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3.ed. Savoy IL: IETS, 83-88.

STURMEY, R.G.; HAWKHEAD, J.A.; BARKER, E.A.; LEESE, H.J. 2009. DNA damage and metabolic activity in the preimplantation embryo. **Human Reproduction**, **24**: 81–91.

SUSNOW, N.; ZENG, L.; MARGINEANTU, D.; HOCKENBERY, D.M. 2009. Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress. **Seminars in Cancer Biology**, **19**: 42-49.

TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; MIWA, I.; TANIGUCHI, K.; MAEKAWA, R.; ASADA, H.; TAKETANI, T.; MATSUOKA, A.; YAMAGATA, Y.; SHIMAMURA, K.; MORIOKA, H.; ISHIKAWA, H.; REITER, R.J.; SUGINO, N. 2008. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. **Journal of Pineal Research**, **44**: 280-287.

TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; NAUWYNCK, H.; CORYN, M.; KRUIF, A. 2002. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, **61 (3)**: 414-424.

TELFORD, N.A.; WATSON, A.J.; SCHULTZ, G.A. 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Molecular Reproduction and Development**, **26**: 90-100.

THIBIER, M. 2008. International embryo transfer society: Data retrieval committee annual report. **Embryo Transfer Newsletter**, **26 (4)**: 4-9.

THOMPSON, J.G. 2000. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos-a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, **60**: 263-275.

TILLY, J.L. 2001. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, **2**: 838-848.

TONG, Z.B.; GOLD, L.; PFEIFER, K.E.; DORWARD, H.; LEE, E.; BONDY, C.A.; DEAN, J.; NELSON, L.M. 2000. Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. **Nature Genetics**, **26**: 267-268.

TONG, Z.B.; GOLD, L.; DE POL, A.; VANEVSKI, K.; DORWARD, H.; SENA, P.; PALUMBO, C.; BONDY C.A.; NELSON, L.M. 2004. Developmental expression and subcellular localization of mouse MATER, an oocyte-specific protein essential for early development. **Endocrinology**, **145**: 1427-1434.

UEDA, S.; MASUTANI, H.; NAKAMURA, H.; TANAKA, T.; UENO, M.; YODOI, J. 2002. Redox control of cell death. **Antioxidants e Redox Signaling**, **4 (3)**: 405-414.

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

VAN DELFT, M.F.; HUANG, D.C. 2006. How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. **Cell Research**, **16**: 203-213

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, **63**: 1717-1751.

VANROOSE, G.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. 2001. From co-culture to defined

medium: state of the art and practical considerations. **Reproduction in Domestic Animals**, **36**: 25-28.

VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. 2008. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, **32 (2)**: 100-109.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; FERREIRA, A.M.; AS, W.F.; FERNANDES, A.C.; MARQUES-JR, A.P. 2004. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal Reproduction Science**, **84**: 1-12.

VIGNEAULT, C.; MCGRAW, S.; MASSICOTTE, L.; SIRARD, M.A. 2004. Transcription factor expression patterns in bovine in vitro-derived embryos prior to maternal-zygotic transition. **BMC Biology Reproduction**, **70**: 1701-1709.

VIREQUE, A.A.; CAMARGO, L.S.; SERAPIÃO, R.V.; ROSA, S.A.A.; WATANABE, Y.F.; FERREIRA, E.M.; NAVARRO, P.A.; MARTINS, W.P.; FERRIANI, R.A. 2009. Preimplantation development and expression of Hsp-70 and Bax genes in bovine blastocysts derived from oocytes matured in alpha-MEM supplemented with growth factors and synthetic macromolecules. **Theriogenology**, **71 (4)**: 620-627.

VORONINA, E.; WESSEL, G.M. 2003. The regulation of oocyte maturation. **Current Topics in Developmental Biology**, **58**: 53-110.

WARZYCH, E.; PEIPPO, J.; SZYDLOWSKI, M.; LECHNIAK, D. 2007. Supplements to in vitro maturation media affect the production of bovine blastocysts and their apoptotic index but not the proportions of matured and apoptotic oocytes. **Animal Reproduction Science**, **97**: 334-343.

WATSON, A.J.; DE SOUSA, P.; CAVENEY, A.; BARCROFT, L.C.; NATALE, D.; URQUHART, J.; WESTHUSIN, M.E. 2000. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number and apoptosis. **BMC**

Biology of Reproduction, 62: 355-364.

WATSON, A.J. 2007. Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence. **Journal of Animal Science, 85:** 1-3.

WEST, K.L. 2004. HMGN proteins play roles in DNA repair and gene expression in mammalian cells. **Biochemical Society Transactions, 32:** 918-919.

WILKINSON, R.F.; MING, R.; ANDERSON, B.; BUNCH, T.D.; WHITE, K.L. 1996. The use of neural networks in developing novel embryo culture media-formulations. **Theriogenology, 45:** 41-49.

WRENZYCKI, C.; HERRMAN, D.; NIEMMAN, H. 2007. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. **Theriogenology, 68:** 77-83.

WU, X.; VIVEIROS, M.M.; EPPIG, J.J.; BAI, Y.; FITZPATRICK, S.L.; MATZUK, M.M. 2003. Zygote arrest 1 (Zar1) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. **Nature Genetics, 33:** 187-191.

YANG, H.W.; HWANG, K.J.; KWON, H.C.; KIM, H.S.; CHOI, K.W.; OH, K.S. 1998. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. **Human Reproduction, 13:** 998-1002.

YANG, M.Y.; RAJAMAHENDRAN, R. 2002. Expression of Bcl-2 e Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. **Animal Reproduction Science, 70:** 159-169.

YOON, S.J.; CHUNG, H.M.; CHA, K.Y.; KIM, N.H.; LEE, K.A. 2005. Identification of differential gene expression in germinal vesicle vs. metaphase II mouse oocytes by using annealing control primers. **Fertility and Sterility, 83:** 1293-1296.

YOSHIDA, K.; MIKI, Y. 2004. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. **Cancer Science, 95:** 866-871.

YUAN, Y.Q.; VAN SOOM, A.; COOPMAN, F.O.; MINTIENS, K.; BOERJAN, M.L.; VAN ZEVEEREN, A.; DE KRUIF, A.; PEELMAN, L.J. 2003. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. **Theriogenology**, **59**: 1585-1596.

ZHANG, X.; LI, X.H.; MA, X.; WANG, Z.H.; LU, S.; GUO, Y.L. 2006. Redox-induced apoptosis of human oocytes in resting follicles *in vitro*. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, **13**: 451-458.

ZHENG, P.; SCHRAMM, D.R.; LATHAM, K.E. 2005. Developmental regulation and *in vitro* culture effects on expression of DNA repair and cell cycle checkpoint control genes in Rhesus Monkey oocytes and embryos. **Biology of Reproduction**, **72**: 1359-1369.

ZHU, N.; HANSEN, U. 2007. HMGN1 modulates estrogen-mediated transcriptional activation through interactions with specific DNA-binding transcription factors. **Molecular and Cellular Biology**, **27 (4)**: 8859–8873.

ZUELKE, K.A.; JONES, D.P.; PERREAULTS, S.D. 1997. Glutathione oxidation is associated with altered microtubule function and disrupted fertilization in mature hamster oocytes. **Biology of Reproduction**, **57**: 1413-1419.