

Mariana Groke Marques

Efeito da tensão de oxigênio e do meio na maturação oocitária *in vitro* e sua influencia no desenvolvimento embrionário em suínos.

**São Paulo
2009**

MARIANA GROKE MARQUES

**Efeito da tensão de oxigênio e do meio na maturação
oocitária *in vitro* e sua influencia no desenvolvimento
embrionário em suínos.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Reprodução Animal da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. José Antônio Visintin

São Paulo

2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2179
FMVZ

Marques, Mariana Groke
Efeito da tensão de oxigênio e do meio na maturação oocitária in vitro e sua influência no desenvolvimento embrionário em suínos / Mariana Groke Marques. – 2009.
112 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Visintin.

1. Maturação oocitária. 2. Tensão de oxigênio. 3. Fluido folicular. 4. Álcool polivinílico. 5. Suínos. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão de Bioética

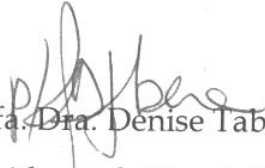
PARECER

Interessado: Mariana Groke Marques

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 803/2005, intitulado: "Efeito da tensão de oxigênio e do meio na maturação in vitro e sua influência no desenvolvimento embrionário em suínos", no qual foram utilizados 03 (três) suínos, sob responsabilidade do Prof. Dr. José Antonio Visintin, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 30 de setembro de 2009


Prof. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MARQUES, Mariana Groke

Título Efeito da tensão de oxigênio e do meio na maturação oocitária *in vitro* e sua influencia no desenvolvimento embrionário em suínos.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

***A minha família.
A todos meus verdadeiros amigos.***

AGRADECIMENTOS

Ao excelentíssimo senhor diretor da FMVZ – USP, que nada.....antes de ser tudo isso ai, ele já era a muito tempo o Zé Tunico, meu orientador, que me agüenta a 11 anos, um exemplo de dedicação e dignidade. Quando estou dando aula que percebo que você me ensinou, muito mais do que ser pós graduanda, você me ensinou a ensinar. Obrigada!

A minha família: minha mãe, meu pai, minha irmã, ao Bao, a Pri e as duas princesinhas da casa, Maria e Manu. Por todo apoio, amor e por sempre acreditarem que de um jeito ou de outro eu iria conseguir fazer dar certo. A Lucy participação nesta conquista e pelas ilustrações. Ao Zacks, Bibi e Naomi, pelo amor incondicional.

Ao Wendell por tudo que nós estamos aprendendo e construindo juntos. Eu cresço com você, você cresce comigo.

A Carla....amiga incondicional. Sempre do meu lado para o que der e vier.

Aos meus amigos: Tonhas, Lú, Fer, Fe, Camis, Alice, Dada, Livia, Betinha, Diego, Lucia, Santa e Vilma.

A equipe que realizou este projeto. Aos membros da EQUIPE FIV SUÍNA. Meus irmãozinhos mais novos, Fla e Febes. Pessoas com um coração e um caráter difícil de encontrar. Trabalhar com vocês foi uma honra para mim.

A todos os amigos da família do VRA: Mayra (dupla “aptidão”, amiga e coorientadora), Camilla, Mari Tomas, Julia, Adriano, Weber, Bíola (por todos os papos filosóficos sobre HSPs), Marcella, Marcilio (amigo de plantão para assuntos de TBARS e estatística), Mari Xum, Paulo (falei para você que seríamos muito amigos), Cucu, Zequinha (por todas as piadas rrsrrsrs), Fê, Pedro, Marcinha, Giana, João, Xi, Laurinha.

Aos meus queridos Re e Giuliano. Gordinha, do fundo do meu coração obrigado por tudo, por toda a ajuda e por todos os abraços de urso. Porque homem ou tem ou não tem.....

Aos que sempre estarão por aqui: Ale, Marco, Helo, Maran, Nani, Anibal e Vivi.

A todas as meninas da equipe de baladinhas do VRA: Liege, Lindsay, Ale (de novo) e Loira. Todas as risadas, palhaçadas, danças e noites mal dormidas também

fazem parte desta tese. A Cris (Mozi), eu estava procurando uma amiga de balada e encontrei uma amiga para todas as horas. Você é muito especial. Porque amiga é amiga.....

Ao Cabral, pela colaboração com as coletas *in vivo*, sempre muito divertidas.

A todos do Departamento de Reprodução Animal- FMVZ/USP: alunos, docentes e funcionários.

Mais uma vez agradeço ao Ramiro, sei que literalmente a sua vida foi a minha pesquisa.

Ao Alex e a Profa. Toshie Kawano pelo uso do microscópio confocal.

Ao Prof. Leonardo José Richtzenhain pelo uso do leitor de Elisa.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio financeiro.

***"Os sonhos são como vento, você sente,
mas não sabe de onde eles vieram
e nem para onde vão.
Eles inspiram o poeta,
animam o escritor,
arrebataam o estudante,
abrem a inteligência do cientista,
dão ousadia ao líder.***

***Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis,
as pedras do caminho se tornam montanhas,
os fracassos se transformam em golpes fatais.***

***Mas, se você tiver grandes sonhos.....
seus erros produzirão crescimentos,
seus desafios produzirão oportunidades,
seus medos produzirão coragem."***

Augusto Cury

RESUMO

MARQUES, M. G. **Efeito da tensão de oxigênio e do meio na maturação oocitária *in vitro* e sua influência no desenvolvimento embrionário em suínos.** [Effect of oxygen tension and media on *in vitro* oocyte maturation and its influence in the porcine embryonic development]. 2009. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências – Programa de Pós graduação em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência da baixa tensão de oxigênio (5% de CO₂; 5% de O₂ e 90% de N₂) na maturação oocitária *in vitro* em meio quimicamente definido (0,1% de PVA) ou suplementado com 10 % de PFF. Foram avaliados a migração dos grânulos corticais, a quantificação e distribuição da proteína HSP70, a maturação nuclear, as concentrações intracelulares da glutatona reduzida, a avaliação dos índices de penetração espermática e o desenvolvimento e qualidade de embriões fecundados *in vitro* em oócitos antes da maturação (0 hora) e após a maturação *in vitro* nos diferentes tratamentos (atmosfera = 5 ou 20% de O₂ e suplementação do meio de maturação = 0,1% de PVA ou 10% de PFF). Para verificar a influência da atmosfera e da suplementação do meio no sistema de maturação foram avaliados o ciclo celular das células do cumulus, o número de células do cumulus por oócitos, as concentrações intracelulares de glutatona reduzida (GSH) das células do cumulus, as concentrações de TBARS no meio de maturação e a resistência das células do cumulus ao estresse oxidativo. Avaliações quanto às concentrações de GSH e HSP70 foram realizadas em oócitos *in vivo*, visando comparar a eficiência do sistema *in vitro*. Para a maioria dos parâmetros avaliados não houve interação entre a atmosfera e a suplementação do meio de maturação, indicando que o efeito da atmosfera independe do meio utilizado. Foi observado que em atmosfera com baixa tensão de O₂ houve diminuição da concentração de glutatona nas células do cumulus, do índice de clivagem e do número total de blastômeros dos embriões e houve aumento do número de células por oócito após o período de maturação *in vitro*. A suplementação do meio de maturação com 0,1% de PVA diminuiu os índices de migração dos grânulos corticais, contudo não alterou os índices de penetração espermática. Os oócitos do grupo 0 hora apresentaram índices maiores de HSP70 do que cada um dos demais grupos, indicando provável diminuição dos estoques de HSP70 durante o período de maturação em todos os grupos de maturação *in vitro*.

As células do cumulus provenientes de oócitos maturados em meio suplementado com 0,1% de PVA apresentaram maior número de células na fase S e G2/M do que o grupo 0 hora, entretanto isso não refletiu em aumento no número de células por oócito após a maturação. Este trabalho permite concluir que o uso de baixa tensão de oxigênio não melhora as condições do sistema de maturação oocitária *in vitro* em suínos, sendo que o efeito do uso desta atmosfera é, na maioria das variáveis avaliadas, independente do tipo de suplementação que se utiliza no meio de maturação *in vitro*.

Palavras-chave: Maturação oocitária. Tensão de oxigênio. Fluido folicular. Álcool polivinílico. Suínos.

ABSTRACT

MARQUES, M.G. **Effect of oxygen tension and media on *in vitro* oocyte maturation and its influence in the porcine embryonic development** [Efeito da tensão de oxigênio e do meio na maturação oocitária *in vitro* e sua influencia no desenvolvimento embrionário em suínos]. 2009. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências – Programa de Pós graduação em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The aim of this study was to evaluate the efficiency of low oxygen tension (5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂) on *in vitro* oocyte maturation using defined media (0.1% PVA) or supplemented with 10% PFF. To achieve this goal, oocytes were evaluated prior to *in vitro* maturation (0 hour) and after *in vitro* maturation on different treatments (atmosphere = 5 or 20% O₂ and media supplementation = 0.1% PVA or 10% PFF) for cortical granules migration, quantification and distribution of HSP70 protein, nuclear maturation, intracellular concentrations of reduced glutathione, evaluation of sperm penetration and development and quality of *in vitro*-produced embryos. Furthermore, to evaluate the effects on maturation system, several factors were analyzed, such as: the cell cycle phase of cumulus cells, the number of cumulus cells per oocyte, the intracellular concentrations of reduced glutathione in cumulus cells, the concentrations of TBARS in maturation media and the resistance of cumulus cells to the oxidative stress. Some of these evaluations were performed on *in vivo* oocytes, aiming to analyze oocyte competence after *in vitro* maturation. Concerning the majority of the parameters analyzed, there were no interaction between atmosphere and the supplementation of maturation media, indicating that the effect of atmosphere is independent of the media used. It was possible to observe that low tension atmosphere of O₂ decreased glutathione concentrations in cumulus cells, cleavage rate and total number of embryo blastomeres and increased the number of cells per oocyte after the period of *in vitro* maturation. The maturation media supplementation with 0.1% PVA decreased the migration of cortical granules; however this fact did not have effect on *in vitro* sperm penetration levels. The 0 hour oocytes showed higher levels of HSP70 than each one of the *in vitro* matured groups, indicating decrease of this protein stock during the maturation period in all of

the *in vitro* matured groups. The cumulus cells originated from matured oocytes in supplemented media with 0.1% PVA showed higher number of cells in S and G2/M phase than 0 hour group; however this fact did not reflect in increased cell numbers per oocyte after maturation. Therefore, the use of low oxygen tension does not improve the conditions of the *in vitro* porcine oocyte maturation system and their effect in most of the factors analyzed is not dependent on the supplementation of maturation media.

Keywords: Oocyte maturation. Oxygen tension. Follicular fluid. Polyvinyl alcohol. Porcine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Formação das espécies reativas de oxigênio (ROS). Fonte: Nichi (2003)..29
- Figura 2 - Interconversão da glutatona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutatona peroxidase (GHS-Px), glutatona oxidase (GO) e glutatona redutase (GR). Fonte: Rover Jr. et al (2001).....30
- Figura 3 - Esquema de montagem dos oócitos para análise em microscópio confocal. Lâmina (1). Deposição circular da solução de parafina/vaselina (2). O sistema é preenchido com DABCO (3). Os oócitos são depositados no centro (4). Ao redor da parafina/vasilina foi colocada uma fina camada de cola (Araldite®) (5). O sistema foi finalizado com a deposição delicada de uma lamínula (6).50
- Figura 4 - Exemplo de reta padrão construída com concentrações conhecidas de GSH, utilizada para a conversão (emissão para concentração) de valores obtidos das amostras de oócitos54
- Figura 5 - Esquema das avaliações realizadas nos oócitos e células do cumulus provenientes do grupo 0 hora.....60
- Figura 6 - Esquema das avaliações realizadas nos oócitos e células do cumulus provenientes dos grupos em que foi realizada a maturação *in vitro*.....61
- Figura 7 - Esquema das avaliações realizadas nos oócitos provenientes dos grupos em que foi realizada a maturação *in vivo* e o grupo em que foi induzido o estresse oxidativo.....61
- Figura 8 - Marcação dos grânulos corticais (FITC - verde) e da cromatina (Iodeto de propídeo - vermelho). Em A, oócito com grânulos difusos e cromatina em vesícula germinativa. Em B, oócito com grânulos na periferia celular e cromatina em metáfase II64

Figura 9 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação na média das porcentagens de grânulos corticais presentes no halo externo de 20% do diâmetro de oócitos maturados <i>in vitro</i> . Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa (P<0,05). Os dados representam médias dos quadrados mínimos ± EP	65
Figura 10 - Médias das porcentagens de grânulos corticais presentes no halo externo de 20% do diâmetro de oócitos antes (0 hora), depois da maturação <i>in vitro</i> nos diferentes tratamentos e da maturação <i>in vivo</i> . Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa (P<0,05). Os dados representam as médias dos quadrados mínimos ± EP	66
Figura 11 - Média das concentrações de HSP70 (intensidade de pixels x 10 ⁻⁶) em oócitos maturados <i>in vitro</i> nos diferentes tratamentos. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa (P<0,05). Os dados representam as médias dos quadrados mínimos ± EP.....	68
Figura 12 - Média das concentrações de HSP70 (intensidade de pixels x 10 ⁻⁶) de oócitos antes da maturação (0 hora) e depois da maturação <i>in vitro</i> nos diferentes tratamentos e da maturação <i>in vivo</i> . Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa (P<0,05). Os dados representam as médias dos quadrados mínimos ± EP.....	69
Figura 13 - Média das concentrações de HSP70 (intensidade de pixels x 10 ⁻⁶) de oócitos antes da maturação (0 hora) e após a indução do estresse oxidativo. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa (P<0,05). Os dados representam as médias dos quadrados mínimos ± EP	69
Figura 14 - Distribuição da HSP70 (FITC - verde) e marcação da cromatina (Iodeto de propídeo - vermelho). Nos oócitos imaturos (0 hora) em A, observa-se a presença da HSP70 no interior do núcleo, o que não foi observado em B. Observou-se a migração da HSP70 para o corpúsculo polar em parte dos oócitos maduros (C)	70

Figura 15 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação na média das porcentagens de Vesícula germinativa e quebra da vesícula germinativa de oócitos maturados <i>in vitro</i> . Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP	72
Figura 16 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação na média das porcentagens de Metáfase 1 de oócitos maturados <i>in vitro</i> . Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP	72
Figura 17 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação na média das porcentagens de Metáfase 2 de oócitos maturados <i>in vitro</i> . Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP	72
Figura 18 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação na média das concentrações intracelular de GSH (μ mol/oócito) de oócitos maturados <i>in vitro</i> . Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP	73
Figura 19 - Média das concentrações de glutatona de oócitos antes (0 hora) e depois da maturação <i>in vitro</i> nos diferentes tratamentos e da maturação <i>in vivo</i> . Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP.....	74
Figura 20 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação na média das porcentagens de zigotos monospérmicos após a fecundação <i>in vitro</i> de oócitos maturados <i>in vitro</i> nos diferentes tratamentos. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP	75
Figura 21 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação na média das porcentagens de zigotos polispérmicos após a fecundação <i>in vitro</i> de oócitos maturados <i>in vitro</i> nos diferentes tratamentos. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP	76
Figura 22 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação na média das porcentagens de oócitos não fecundados após a fecundação <i>in vitro</i> de oócitos maturados <i>in vitro</i> nos diferentes tratamentos. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP	76

- Figura 23 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação na média das porcentagens de zigotos clivados (dia 3 de desenvolvimento) após a fecundação de oócitos maturados *in vitro* nos diferentes tratamentos. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($P < 0,05$). Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP 78
- Figura 24 - Média das porcentagens de blastocistos sobre o número de zigotos clivados (dia 7 de desenvolvimento) após a fecundação de oócitos maturados *in vitro* nos diferentes tratamentos. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP 78
- Figura 25 - Média das porcentagens de blastocistos sobre o número de oócitos (dia 7 de desenvolvimento) após a fecundação de oócitos maturados *in vitro* nos diferentes tratamentos. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP 79
- Figura 26 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação no número médio de células dos blastocistos produzidos por fecundação de oócitos maturados *in vitro* nos diferentes tratamentos. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($P < 0,05$). Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP 80
- Figura 27 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação no número médio de células em necrose dos blastocistos produzidos por fecundação de oócitos maturados *in vitro* nos diferentes tratamentos. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP 80
- Figura 28 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação no número médio de células em apoptose dos blastocistos produzidos por fecundação *in vitro* de oócitos maturados *in vitro* nos diferentes tratamentos. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP 81

Figura 29 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação nas médias das porcentagens de células do cumulus na fase G0/G1 do ciclo celular. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP	82
Figura 30 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação nas médias das porcentagens de células do cumulus na fase S do ciclo celular. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP.....	83
Figura 31 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação nas médias das porcentagens de células do cumulus na fase G2/M do ciclo celular. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($P < 0,05$). Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP	83
Figura 32 - Média das porcentagens de células do cumulus em cada fase do ciclo celular provenientes de oócito antes (0 hora) e depois da maturação <i>in vitro</i> nos diferentes tratamentos. Letras diferentes sobrescritas em cada barra, dentro de cada fase do ciclo celular, representam diferença significativa ($P < 0,05$). Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP	84
Figura 33 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação no número médio de células do cumulus por oócito maturados <i>in vitro</i> nos diferentes tratamentos. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($P < 0,05$). Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP	85
Figura 34 - Média do número de células por oócito antes (0 hora) e depois da maturação <i>in vitro</i> nos diferentes tratamentos. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($P < 0,05$). Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP.....	86
Figura 35 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação na média das concentrações intracelular de GSH (pmol/célula) de células provenientes de oócitos maturados <i>in vitro</i> . Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP	87

Figura 36 - Média das concentrações de glutathiona por célula do cumulus pertencentes a oócitos antes (0 hora) e depois da maturação <i>in vitro</i> nos diferentes tratamentos. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP	88
Figura 37 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação nas médias das concentrações de TBARS nos meios após as 22 horas iniciais da maturação oocitária. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP	89
Figura 38 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação nas médias das concentrações de TBARS nos meios após as 22 horas finais da maturação oocitária. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP	90
Figura 39 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação nas médias das concentrações de TBARS nas células do cumulus após o teste de resistência ao estresse oxidativo. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP	91
Figura 40 - Média das concentrações de TBARS por célula do cumulus pertencentes a oócitos antes (0 hora) e depois da maturação <i>in vitro</i> nos diferentes tratamentos após o teste de resistência ao estresse oxidativo. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP	91

LISTA DE TABELAS

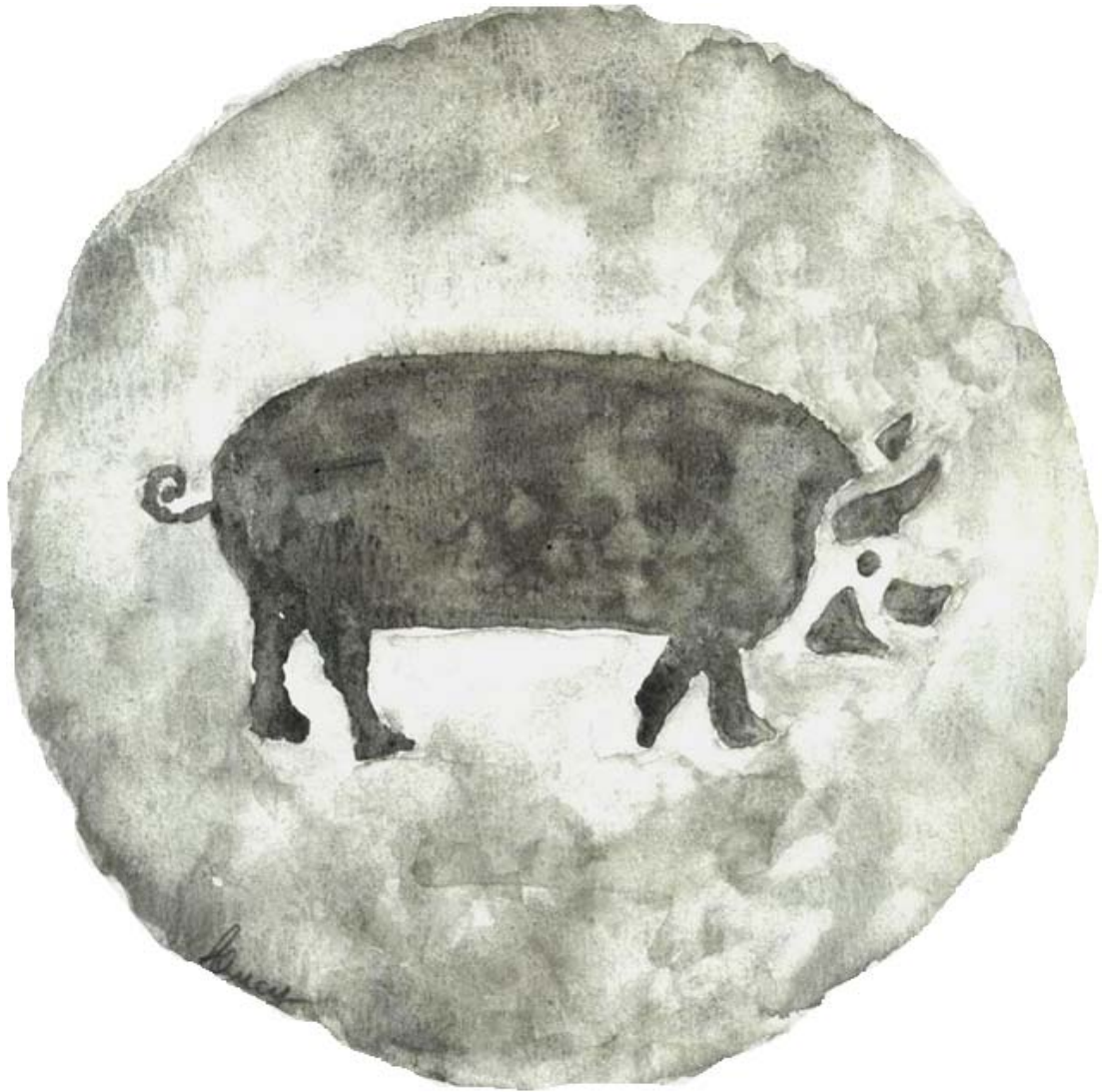
- Tabela 1 - Efeito (p) da réplica, atmosfera, suplementação do meio de maturação e interação entre a atmosfera e a suplementação do meio de maturação nos índices de migração dos grânulos corticais, São Paulo, 2009 65
- Tabela 2 - Efeito (p) da réplica, atmosfera, suplementação do meio de maturação e interação entre a atmosfera e a suplementação do meio de maturação nos índices de quantificação da proteína HSP70, São Paulo, 2009 67
- Tabela 3 - Efeito (p) da réplica, atmosfera, suplementação do meio de maturação e interação entre a atmosfera e a suplementação do meio de maturação nos índices de vesícula germinativa/quebra da vesícula germinativa, Metáfase 1 e Metáfase 2, São Paulo, 2009 71
- Tabela 4 - Efeito (p) da réplica, atmosfera, suplementação do meio de maturação e interação entre a atmosfera e a suplementação do meio de maturação na média das concentrações intracelulares de glutathiona dos oócitos, São Paulo, 2009 73
- Tabela 5 - Efeito (p) da réplica, atmosfera, suplementação do meio de maturação e interação entre a atmosfera e a suplementação do meio de maturação nos índices monospermia, polispermia e oócitos não fecundados, São Paulo, 2009 75
- Tabela 6 - Efeito (p) da réplica, atmosfera, suplementação do meio de maturação e interação entre a atmosfera e a suplementação do meio de maturação nos índices de clivagem, blastocistos/clivados e blastócitos/fecundados, São Paulo, 2009 77
- Tabela 7 - Efeito (p) da réplica, atmosfera, suplementação do meio de maturação e interação entre a atmosfera e a suplementação do meio de maturação nas médias de número total de blastômeros, número de blastômeros em necrose e número de blastômeros em apoptose, São Paulo, 2009 79

Tabela 8 - Efeito (p) da réplica, atmosfera, suplementação do meio de maturação e interação entre a atmosfera e a suplementação do meio de maturação nas médias das porcentagens de células do cumulus em cada fase do ciclo celular, São Paulo, 2009	82
Tabela 9 - Efeito (p) da réplica, atmosfera, suplementação do meio de maturação e interação entre a atmosfera e a suplementação do meio de maturação nas médias de número de médio de células do cumulus por oócito, São Paulo, 2009	85
Tabela 10 - Efeito (p) da réplica, atmosfera, suplementação do meio de maturação e interação entre a atmosfera e a suplementação do meio de maturação nas médias das concentrações intracelulares de glutathiona das células do cumulus, São Paulo, 2009	87
Tabela 11 - Efeito (p) da réplica, atmosfera, suplementação do meio de maturação e interação entre a atmosfera e a suplementação do meio de maturação nas médias das concentrações de TBARS nos meios após as 22 horas iniciais ou 22 horas finais de maturação, São Paulo, 2009	89
Tabela 12 - Efeito (p) da réplica, atmosfera, suplementação do meio de maturação e interação entre a atmosfera e a suplementação do meio de maturação nas médias das concentrações de TBARS por célula do cumulus, São Paulo, 2009	90

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	28
2.1 O ESTRESSE OXIDATIVO	28
2.2 MATURAÇÃO OOCITÁRIA.....	32
2.2.1 Estresse oxidativo na maturação oocitária.....	34
2.2.2 Papel das células do cumulus na maturação oocitária.....	35
2.2.3 O papel da glutathiona no oócito.....	36
2.2.4 Migração dos grânulos corticais.....	37
2.2.5 A HSP70 no oócito	38
2.3 FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i> (FIV).....	39
2.4 CULTIVO DE EMBRIÕES <i>IN VITRO</i>	40
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	42
3.1 HIPÓTESE	42
3.2 OBJETIVOS	42
4 MATERIAL E MÉTODO	45
4.1 COLHEITAS DOS OÓCITOS.....	45
4.1.1 Colheita dos oócitos para maturação vitro.	45
4.1.2 Colheita dos oócitos maturados <i>in vivo</i>	47
4.2 AVALIAÇÕES DA MATURAÇÃO OOCITÁRIA	48
4.2.1 Avaliação da migração dos grânulos corticais	48
4.2.2 Quantificação e localização da proteína HSP70 nos oócitos	51
4.2.3 Avaliação da maturação nuclear	52
4.2.4 Avaliação das concentrações de glutathiona reduzida (GSH)	53
4.2.5 Fecundação <i>in vitro</i> (FIV) e avaliação dos índices de penetração espermática	54
4.2.6 Cultivo <i>in vitro</i> e avaliação do número e viabilidade de blastômeros	56
4.3 AVALIAÇÕES DO SISTEMA DE MATURAÇÃO OOCITÁRIA	57

4.3.1	Análise do ciclo celular das células do cumulus por citometria de fluxo.....	57
4.3.2	Número de células do cumulus por oócito	58
4.3.3	Avaliação das concentrações de glutathiona reduzida (GSH) nas células do cumulus.	58
4.3.4	Avaliação dos TBARS nos meios de maturação.....	59
4.3.5	Avaliação da resistência das células do cumulus ao estresse oxidativo.....	60
4.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	60
4.5	ANALISE ESTATÍSTICA	62
5	RESULTADOS.....	64
5.1	AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO OOCITÁRIA.....	64
5.1.1	Avaliação da migração dos grânulos corticais	64
5.1.2	Quantificação e localização da proteína HSP70 nos oócitos	67
5.1.3	Avaliação da Maturação nuclear	71
5.1.4	Avaliação da concentração oocitária de glutathiona reduzida.....	73
5.1.5	Avaliação dos índices de penetração espermática	74
5.1.6	Cultivo <i>in vitro</i> e avaliação do número e viabilidade de blastômeros	76
5.2	AVALIAÇÕES DO SISTEMA DE MATURAÇÃO OOCITÁRIA	81
5.2.1	Análise do ciclo celular das células do cumulus por citometria de fluxo.....	81
5.2.2	Número de células do cumulus por oócito	84
5.2.3	Avaliação das concentrações de glutathiona reduzida (GSH) nas células do cumulus.	86
5.2.4	Avaliação dos TBARS nos meios de maturação.....	88
5.2.5	Avaliação da resistência das células do cumulus ao estresse oxidativo.....	90
6	DISCUSSÃO	93
7	CONCLUSÕES	100
	REFERÊNCIAS	102
	ANEXOS.....	108



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Para o avanço das biotécnicas da reprodução como a inseminação artificial, transferência de embriões, sincronização do ciclo estral, produção de embriões *in vitro*, transferência nuclear e transgenia, é necessário conhecer profundamente a anatomia, morfologia, fisiologia e aspectos moleculares de cada espécie animal, visando o melhoramento genético, aumento da produtividade, maximização da eficiência reprodutiva e viabilização econômica da produção animal.

O estudo da produção *in vitro* de embriões em suínos é importante pelo interesse econômico e científico, pois objetiva a melhoria da produtividade da espécie e o aprimoramento dos conhecimentos em fisiologia da maturação oocitária, fecundação e cultivo embrionário, servindo como suporte para a transferência nuclear e a transgenia.

A maturação oocitária é considerada uma das fases mais importantes do processo de produção *in vitro* de embriões, pois é neste período que o oócito além de sofrer modificações nucleares (maturação nuclear) passa por mudanças bioquímicas, estruturais e citoesqueléticas (maturação citoplasmática) que serão responsáveis e essenciais para o desenvolvimento inicial do embrião após a fecundação.

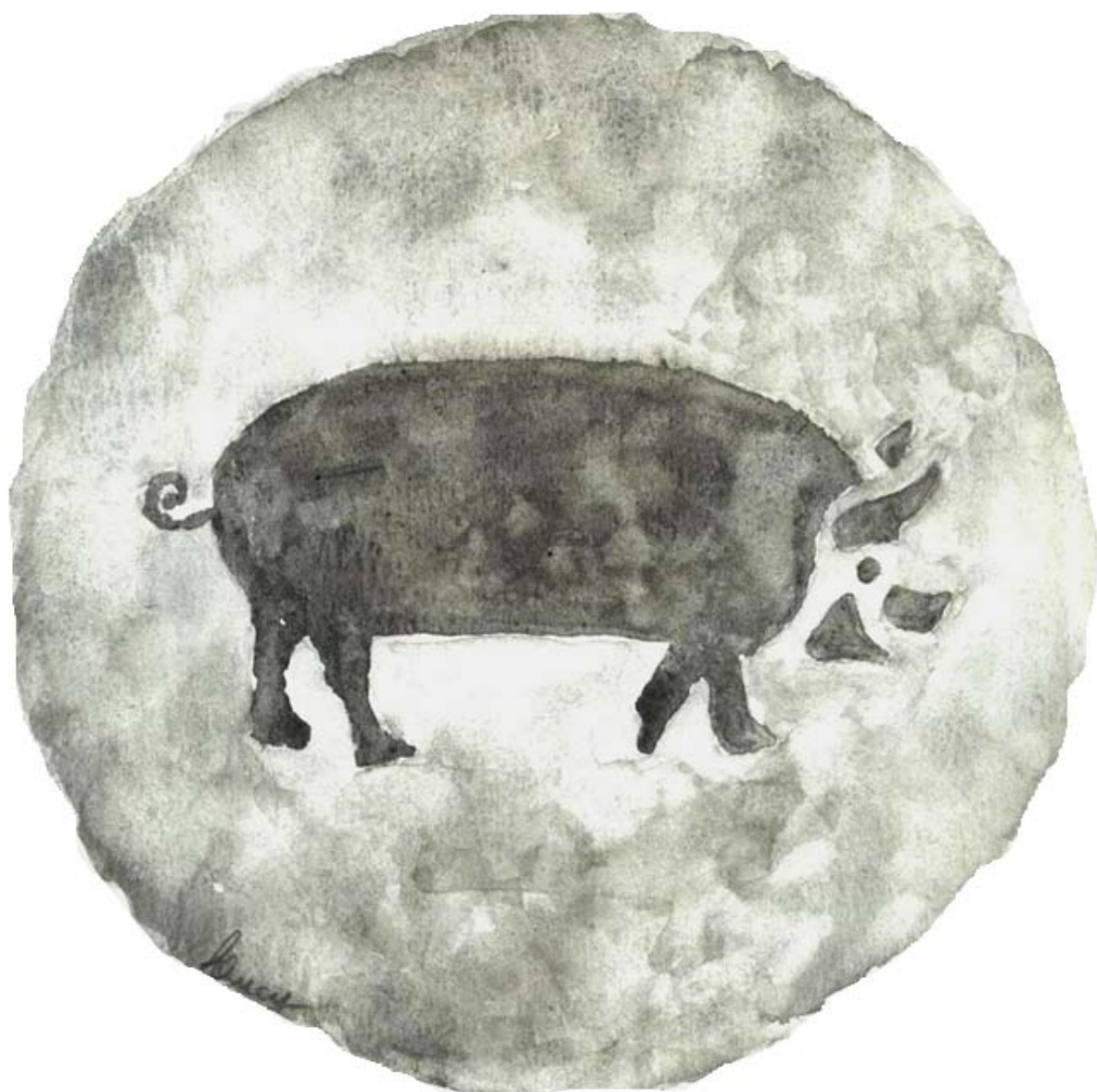
A maturação *in vitro* (MIV) ainda não apresenta a mesma eficiência da *in vivo*, sendo necessários estudos sobre os meios e os sistemas de cultivo para obtenção de melhores índices *in vitro*. Oócitos maturados *in vitro* apresentam, por exemplo, baixas concentrações de glutatona, menor migração e conteúdo imaturo dos grânulos corticais. Estes fatores colaboram para os altos índices de polispermia após a fecundação *in vitro* e para a baixa qualidade dos embriões produzidos pelo cultivo *in vitro*.

A suplementação do meio de maturação com fluido folicular suíno (PFF) é utilizada rotineiramente na maturação *in vitro* em suínos. No entanto, sua utilização introduz uma série de fatores desconhecidos ao sistema. Como alternativa, vários pesquisadores vem desenvolvendo meios de maturação contendo outras macromoléculas, como o álcool polivinílico (PVA).

No entanto, é sabido que o PFF contém antioxidantes como, por exemplo, a super óxido dismutase que não estão presentes no meio suplementado com PVA, tornando este sistema possivelmente mais sensível ao estresse oxidativo.

Em geral, os protocolos de maturação de oócitos *in vitro* utilizam altas tensões de O₂ (20%), o que aumenta as concentrações de espécies reativas de oxigênio que são altamente deletérias, podendo causar injúrias celulares como bloqueio da meiose, quebra/lesões de DNA e peroxidação de lipídios.

Portanto, o uso de meios de maturação quimicamente definidos em associação a atmosfera com baixa tensão de oxigênio (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂) pode ser uma alternativa para o aperfeiçoamento da maturação oocitária e da produção *in vitro* de embriões suínos.



2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O ESTRESSE OXIDATIVO

É sabido que as células que vivem em condições aeróbias enfrentam constantemente o paradoxo do oxigênio (O_2): este é necessário para suportar a vida, mas os seus metabólitos, coletivamente denominados espécies reativas de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species* - ROS), podem modificar a função das células, colocando em perigo a sobrevivência da mesma (BASINI et al., 2008).

Apesar das ROS em baixas concentrações serem importantes como segundos mensageiros, sendo capazes de modular a expressão dos genes que regulam o processo fisiológico de maturação de gametas, em altas concentrações elas também podem ser responsáveis pelo estresse oxidativo. Sob estas condições, as ROS podem danificar moléculas e estruturas, com efeitos deletérios sobre a função celular (BASINI et al., 2008).

Define-se como espécies reativas de oxigênio toda espécie de composto molecular que possui um ou mais elétrons desemparelhados. Este elétron, que caracteriza as espécies reativas de oxigênio, pode ocorrer em um átomo de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, carbono, enxofre ou átomos de metais de transição (ROVER JR. et al., 2001).

O estresse oxidativo é resultante de um desequilíbrio entre a produção das espécies reativas de oxigênio e o sistema de defesa antioxidante da célula. Durante o desenvolvimento embrionário, as espécies reativas de oxigênio que incluem o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH^-) são constantemente liberadas pelo metabolismo celular no processo de quebra de ATP como fonte de energia (FEUGANG et al., 2004). Sua formação é apresentada na figura 1.

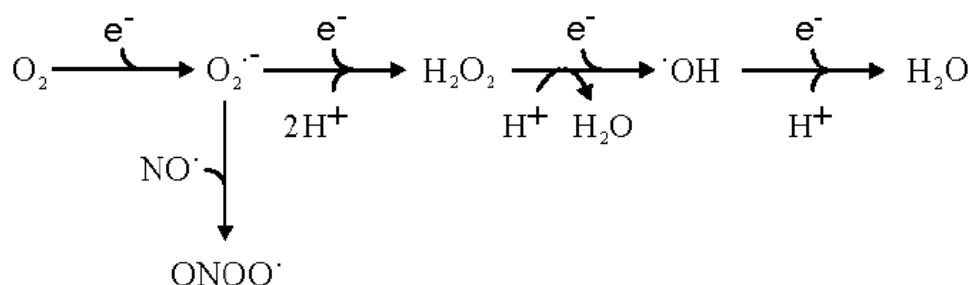


Figura 1 - Formação das espécies reativas de oxigênio (ROS). Fonte: Nichi (2003)

As membranas celulares e intracelulares que possuem grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados são alvos importantes para o ataque de espécies reativas de oxigênio (ROVER JR. et al., 2001). As ROS podem causar peroxidação dos lipídeos e inativação de enzimas, resultando em graves danos celulares (BING et al., 2002). O estresse oxidativo, dependendo da sua severidade, pode levar a célula à morte tanto por necrose quanto por apoptose (KARJA et al., 2004).

A ocorrência de peroxidação lipídica leva ao acúmulo progressivo de hidroperóxidos lipídicos na membrana plasmática que, posteriormente, se decompõem para formar o malondialdeído (NICHII, 2003).

A avaliação dos níveis de malondialdeído tem sido extensivamente utilizada nas últimas décadas como marcador de peroxidação lipídica (JANERO, 1990).

Todos os organismos possuem mecanismos antioxidantes. Estes são classificados como enzimáticos e não enzimáticos. Entre as defesas enzimáticas, a remoção de produtos de oxigênio pode ser catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). A SOD remove o ânion superóxido em uma reação de dismutação, produzindo H_2O_2 e oxigênio molecular. A remoção de H_2O_2 é catalisada pela CAT ou pela GPx. Os antioxidantes não-enzimáticos incluem vitaminas, antioxidantes endógenos e vários compostos, como a glutathiona e ácido úrico (BASINI et al., 2008)

A glutathiona, um tripeptídeo (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina), é encontrada no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, o metabolismo celular e a proteção celular.

O sistema enzimático da glutathiona peroxidase é uma das principais formas de controle do aumento de espécies reativas de oxigênio (ROVER JR. et al., 2001). Outra enzima que age conjuntamente com a glutathiona peroxidase é a enzima glutathiona redutase. Esta enzima não age diretamente na remoção das espécies reativas de oxigênio, porém é responsável pela regeneração da forma reduzida da glutathiona. Na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), a glutathiona redutase impede a paralisação do ciclo metabólico da glutathiona (ROVER JR. et al., 2001). A figura 2 ilustra o ciclo celular da glutathiona.

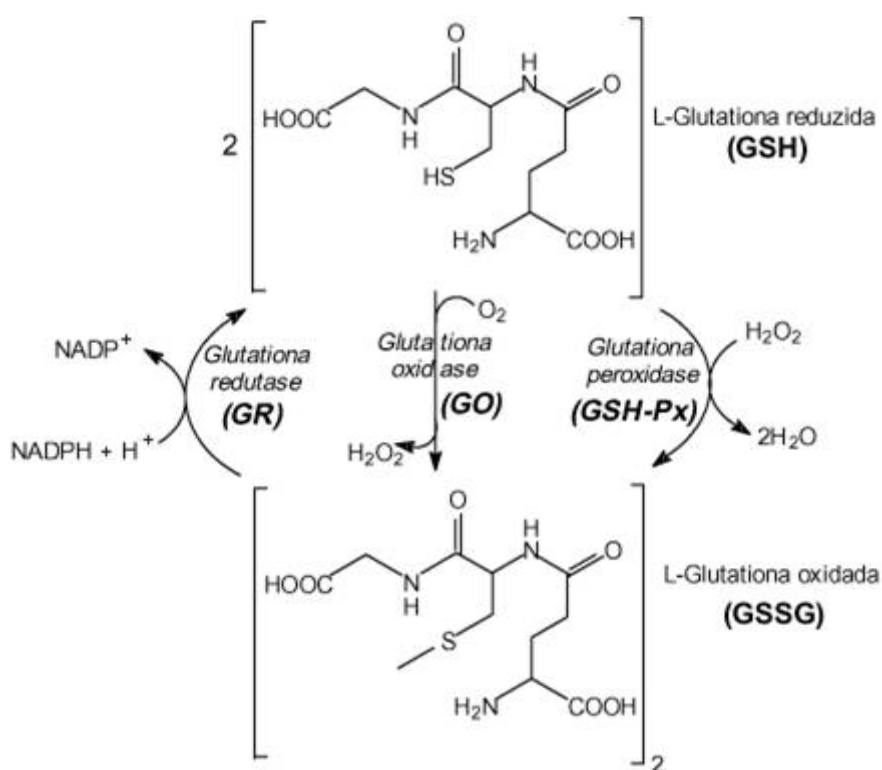


Figura 2 - Interconversão da glutathiona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutathiona peroxidase (GSH-Px), glutathiona oxidase (GO) e glutathiona redutase (GR). Fonte: Rover Jr. et al (2001)

O estresse oxidativo pode causar mudança no estado redox da glutathiona (quantidade de glutathiona na forma reduzida), aumentando a liberação da glutathiona oxidada. Assim, alguns estudos são direcionados no monitoramento da glutathiona em amostras biológicas para estudar o estresse oxidativo (ROVER JR. et al., 2001).

Além dos sistemas antioxidantes, as células animais possuem vários mecanismos de sobrevivência diante de adversidades do micro ambiente. Um exemplo deles são as proteínas do grupo “heat shock proteins” (HSPs) (LIU et al., 2004).

Uma série de características define este grupo de proteínas: (1) todos os organismos estudados variando de bactérias procarióticas aos mamíferos, inclusive o homem, respondem a um aumento de temperatura corpórea por um aumento na síntese de proteínas, sendo que há síntese em grande escala de HSPs, (2) este tipo de resposta celular não foi alterada durante a evolução. As HSPs induzidas são muito semelhantes entre si, mesmo em organismos muito diferentes, compartilhando um alto grau de homologia na seqüência de aminoácidos e (3) alguns membros da família são produzidos somente quando induzidos pelo estresse, enquanto outras são expressas em condições normais. O termo HSP se refere às proteínas induzidas, enquanto HSC indica a forma constitutiva da HSP (NEUER et al., 1999).

A produção da forma induzida acontece em resposta a uma variedade de estresse, incluindo extremos de temperatura, estresse oxidativo, exaustão de energia celular, extrema concentração de íons, diferentes tipos de gases, e várias substâncias tóxicas. (FEDER, 1999).

Em condições fisiológicas as HSPs funcionam como chaperonas (def: serve para designar substâncias que, sem fazer parte da estrutura final de proteínas, evitam interações incorretas entre estas, auxiliam na montagem final das mesmas), colaborando no dobramento de outras proteínas (NEUER et al., 1999).

As HSPs reconhecem e se ligam a outras proteínas quando estas estão em conformações não ativas, evitando a desnaturação destas proteínas devido ao estresse. A ligação ou não das HSPs a uma proteína pode funcionar como sinal celular para hidrólise do polipeptídeo, com a formação de agregados que serão removidos da célula, sendo estas funções as mais importantes para proteção da célula ao estresse (FEDER, 1999).

Além disso, HSP70 protege células mitóticas contra anomalias de divisão evitando danos ao centrossomo (DAUGAARD et al., 2007)

2.2 MATURAÇÃO OOCITÁRIA

No ovário, os oócitos mamíferos permanecem em estágio inicial da divisão meiótica (vesícula germinativa - VG) até a liberação de gonadotrofina pré-ovulatória que estimula a retomada da meiose (RICHARD et al., 1996). Durante a fase final de maturação, os oócitos imaturos progridem de vesícula germinativa (prófase I) para metáfase 2 (M2), estágio em que permanecem até a fecundação ou ativação partenogenética (LONERGAN et al., 2000).

A progressão exata e ordenada do ciclo celular é rigidamente controlada pela seqüência de formação, ativação e inativação de uma série de quinases reguladoras do ciclo celular. A chave para a regulação do ciclo celular são as quinases dependentes de ciclina (CDKs) (SCHUTTE et al., 1997).

Quando aspirados de ovários de matadouro para maturação *in vitro*, os oócitos suínos estão em diferentes estádios de vesícula germinativa e alcançarão o estágio de MII em período de 32 a 44 horas (WU et al., 2002).

Durante o processo de crescimento até a aquisição de competência para o reinício da meiose, o oócito sofre diversas mudanças bioquímicas, estruturais e citoesqueléticas importantes à maturação, fecundação e sustentação do desenvolvimento embrionário. No entanto, o percentual de embriões que se desenvolve a partir de oócitos maturados e fecundados *in vitro* é inferior àquele obtido *in vivo*, em decorrência de problemas no processo de maturação citoplasmática, também denominada capacitação oocitária (BERTAGNOLLI et al., 2004)

Durante a maturação oocitária modificações no número, tamanho e/ou posição das organelas citoplasmáticas têm sido descritas em oócitos de mamíferos. Na reestruturação citoplasmática, a maioria das organelas migra para o centro da célula. Por exemplo, mitocôndrias e o complexo de Golgi localizavam-se periféricamente em oócitos imaturos e centralizados em oócitos maduros. Além disso, o complexo de Golgi diminui o seu desenvolvimento simultaneamente com o agrupamento do retículo endoplasmático liso (ABEYDEERA, 2002).

Os fatores citoplasmáticos gerados durante o desenvolvimento e maturação dos oócitos são essenciais para aquisição da competência meiótica, fecundação e desenvolvimento embrionário. Oócitos com uma maturação nuclear normal, em tempo regular, mas que possuem uma assincronia entre a maturação citoplasmática e a nuclear, não serão fecundados ou não terão um desenvolvimento embrionário adequado (IZADYAR et al., 1997).

Vários meios de maturação são capazes de suportar a maturação nuclear *in vitro* de oócitos suínos. A quebra da vesícula germinativa e a extrusão do primeiro corpúsculo polar ocorrem de forma normal, mas a maturação citoplasmática parece não acontecer adequadamente, o que interfere na formação dos pronúcleos após a penetração do espermatozóide (ABEYDEERA, 2002).

Em outro estudo, Yoshiba et al. (1992) comprovaram que o PFF contém substâncias que melhoram a expansão das células do cumulus, a maturação nuclear e a fecundação, quando é adicionado ao meio de maturação.

Tatemoto et al. (2004) sugerem que o PFF contribui na proteção dos oócitos contra o estresse oxidativo, pois possui altas concentrações de superóxido dismutase, o que melhora a maturação citoplasmática e aumenta a competência de desenvolvimento pós fecundação.

Entretanto, o uso de PFF introduz uma série de fatores não conhecidos ao meio de maturação, o que dificulta a padronização da técnica e a identificação exata de quais substâncias são essenciais para a regulação do processo.

O desenvolvimento de meios sem PFF permite a identificação de condições ótimas de cultivo, além de colaborar para a diminuição da variabilidade entre laboratórios (ABEYDEERA, 2002).

Como alternativa ao uso do PFF, pesquisadores vêm desenvolvendo novos meios de maturação, sendo o álcool polivinílico (PVA) uma alternativa. Porém, para a manutenção da eficiência do processo, os meios com PVA têm que ser suplementados com fatores de crescimento como EGF (KISHIDA et al., 2004) e/ou aminoácidos essenciais e não essenciais (HONG et al., 2004).

Como alternativa para o uso do PVA na maturação, sugere-se o emprego de um sistema que provoque menor estresse oxidativo, como a atmosfera com baixa tensão de oxigênio. O uso de baixa tensão de oxigênio na maturação oocitária é acompanhada da redução na concentração de ROS nas células, o que aumenta o potencial de desenvolvimento dos oócitos (LUBERDA, 2005).

2.2.1 Estresse oxidativo na maturação oocitária

As concentrações de oxigênio em condições *in vivo* (útero e oviduto) estão entre 5-8% (FICHER; BAVISTER, 1993). O uso de tensões de oxigênio supra-fisiológicas geram aumento na formação de espécies reativas de oxigênio e conseqüentemente o estresse oxidativo (SOOM et al., 2002).

Em oócitos, o acúmulo crescente de ROS resulta em despolimerização de microtúbulos, que são mais suscetíveis ao estresse oxidativo quando comparado às alterações no alinhamento cromossômico (CHOI et al., 2007)

Kikuchi et al. (2002) realizaram a maturação de oócitos suínos *in vitro* em atmosferas contendo 5% O₂ e 20% O₂. Seus resultados demonstraram que após a fecundação e o cultivo embrionário *in vitro* por 6 dias, não foram encontradas diferenças nos índices de maturação nuclear e de formação de blastocisto, porém a qualidade dos blastocistos, medida pelo número total de células foi maior em embriões provenientes de oócitos maturados em 5% de O₂.

Quando oócitos foram maturados em tensões de oxigênio de 5% ou 20% de O₂ e depois ativados partenogenicamente e, cultivados *in vitro* por 6 dias, os índices de formação de blastocisto não diferiram. Contudo, o número médio de blastômeros foi maior no grupo maturado com 5% de O₂ (34,6), em comparação com o de 20% de O₂ (25,9) (IWAMOTO et al.; 2005).

Bing et al. (2002) verificaram o efeito da suplementação do meio com cisteamina, em atmosferas contendo 5% ou 20% de O₂ na maturação de oócitos sem células do cumulus (DOs). Apesar da associação da cisteamina e baixas tensões de oxigênio não ter tido efeito no conteúdo de GSH, DOs cultivados sob baixa tensão de oxigênio tiveram maior índice de formação de pró-núcleos

masculino, sugerindo que a atmosfera com 5% de O₂ pode alterar o metabolismo de oócitos, mostrando desta forma uma diferente resposta de penetração do espermatozóide e de formação de pró-núcleos masculinos. Estes resultados indicam que, mesmo na ausência de cisteamina, o metabolismo dos DOs pode ser otimizado pela cultura sob 5% de O₂, propiciando melhoria na formação de pró-núcleos masculinos.

2.2.2 Papel das células do cumulus na maturação oocitária

A maturação oocitária é regulada por uma série de fatores de crescimento produzidos pelas células foliculares. Essa hipótese é confirmada pela produção de fatores de crescimento pelas células ovarianas, pelo acúmulo destes no líquido folicular e pela presença de receptores para fatores de crescimento nos oócitos, além da habilidade de alguns destes fatores, como o EGF, em promover a maturação nuclear *in vitro* de oócitos suínos (SIROTKIN et al., 2000).

As células do complexo cumulus-oócito (CCO) exercem importante papel na regulação da maturação do oócito e a retirada dessas células reduz significativamente o desenvolvimento embrionário subsequente (ZHANG et al., 1995).

Os resultados apresentados por de Matos et al. (2002) sugerem que as células do cumulus durante MIV desempenham um papel importante na síntese de GSH no oócito, permitindo que o oócito utilize cistina e contribuindo para o efeito estimulante exercido por cisteína e cisteamina.

A cisteína é um dos componentes da GSH, sendo essencial no ciclo de gama-glutamil no qual a GSH é sintetizada. Quando a cisteamina é adicionada aos meios de maturação promove a conversão de cistina em cisteína, principalmente em meio TCM 199, que possuem altas concentrações de cistina (NAGAI et al., 2006).

O estresse oxidativo em oócitos suínos maturados *in vitro* pode levar a morte por apoptose pelos seguintes eventos: bloqueio da meiose, quebra e lesões de DNA e ativação da caspase 3. No entanto as células do cumulus têm importante papel na

proteção destes oócitos, principalmente pelo aumento das concentrações de glutathione (TATEMOTO et al.; 2004).

2.2.3 O papel da glutathione no oócito

Um importante evento que ocorre durante a maturação oocitária é a síntese intracelular da glutathione, que possui a função de proteger o DNA, a síntese de proteínas, o transporte de aminoácidos, a formação do pronúcleo masculino e o desenvolvimento embrionário (WHITAKER; KNIGHT, 2004). Funahashi et al. (1994) demonstraram que condições de cultivo que promovam altas concentrações de glutathione intracelular nos oócitos no final da maturação são importantes para o posterior desenvolvimento embrionário *in vitro*.

De Matos et al. (2000) afirmaram que a mensuração da concentração da glutathione em oócitos pós-maturação é um valioso indicador de maturação citoplasmática.

Em oócitos maduros, a glutathione tem importante função na formação do pronúcleo masculino pós fecundação, pois inicia a descondensação da cromatina do espermatozóide (ZUELKE et al., 1997). A glutathione é responsável por reduzir a protamina que, ao se ligar ao íon H^+ , apresenta alta afinidade pela nucleoplasmina, o que provoca o seu desligamento do DNA. A protamina é substituída por histonas, dando início à descondensação da cromatina e à formação do pronúcleo masculino (KNOBIL; NEILL, 1993).

As concentrações de glutathione de oócitos maturados *in vitro* não diferem muito entre as espécies, no entanto, as concentrações de glutathione de oócitos maturados *in vivo* são superiores as maturados *in vitro* (LUBERDA, 2005).

Brad et al. (2003) relataram que em suínos, oócitos maturados *in vivo* apresentam concentrações de glutathione de 36,26 pmol/oócito e maturados *in vitro* de 7,98 pmol/oócito.

Furnus et al. (2008) demonstraram evidências de que o desenvolvimento do embrião *in vitro* é dependente da presença de aminoácidos precursores da síntese de GSH intracelular nos oócitos que darão origem a estes embriões.

2.2.4 Migração dos grânulos corticais

Os grânulos corticais (GCs) estão associados a um segmento do retículo endoplasmático liso e permanecem próximos à periferia da célula. Os GCs são vesículas repletas de enzimas hidrolíticas, proteinases e peroxidases que serão liberadas no espaço perivitelínico após a fecundação, visando impedir a penetração de mais de um espermatozóide no oócito (polispermia). O número de grânulos corticais no córtex é significativamente maior nos oócitos após a quebra da vesícula germinativa que aqueles observados nos oócitos com a vesícula germinativa intacta (ABEYDEERA, 2002).

Wang et al. (1997) descreveram que após o estágio de quebra da vesícula germinativa, os grânulos corticais de oócitos de suínos apresentam-se no córtex e que após o período de maturação, migram, formando um halo próximo da membrana externa do oócito.

Apesar da exocitose dos grânulos corticais parecer similar entre oócitos maturados *in vivo* e *in vitro*, estudos mostram uma incompleta reação da zona pelúcida em oócitos *in vitro*, diminuindo sua ação de impedir a penetração de mais de um espermatozóide. Este fato pode estar correlacionado com a imaturidade da composição destes grânulos levando a alta incidência de polispermia *in vitro* (FUNAHASHI, 2003).

2.2.5 A HSP70 no oócito

Recentes estudos sugerem um papel importante da HSP70 na fecundação e no desenvolvimento embrionário inicial. Matwee et al. (2001) demonstraram que em bovinos, ao utilizarem anticorpos anti-HSP70 houve diminuição dos índices de adesão dos espermatozoides à zona pelúcida, interrupção da finalização da metáfase 2 e diminuição na formação de pronúcleos.

Seguindo esta linha de pesquisa, Bernardini et al. (2004) verificaram que a expressão das proteínas HSC70 e HSP70 encontravam-se aumentada em embriões suínos que sofreram processos de estresse oxidativo e térmico. Demonstrando que as HSPs podem ser utilizadas como forma de avaliação do estresse oxidativo.

Em oócitos de mamíferos existe uma janela de produção desta proteína. O pico de produção das HSPs ocorre durante o período de crescimento do oócito, declinando quando este atinge seu tamanho máximo e após a meiose a síntese cessa completamente. Devido a este fato, os oócitos de mamíferos são tão sensíveis ao estresse (NEUER et al., 1999).

Oócitos de suínos em crescimento sintetizam um grande número de HSP70 sem o efeito do estresse térmico e são capazes de aumentar as concentrações de HSP70 após estresse térmico de, no máximo, uma hora. Em oócitos de tamanho maior, provenientes de folículos de 2-6 mm, grande quantidade de HSP70 foi detectada, sem haver estresse, entretanto essas concentrações diminuíram após o estresse térmico (LÁNSKÁ et al.; 2006).

Oócitos provenientes de folículos pré ovulatórios são incapazes de responder ao estresse térmico com a produção de HSP70, mas contém estoques da forma constitutiva (HSC70) e induzida (HSP70) desta proteína. A HSP70 é estocada em oócitos de camundongos no estágio de vesícula germinativa e mantém altas concentrações de oócitos em meiose 2 (LIU et al., 2004).

A alta concentração de HSP70 no oócito sugere que esta é importante durante o processo de maturação e quando os oócitos são expostos ao estresse térmico ou a outro tipo de estresse, a HSP70 é utilizada para proteger os processos celulares (LÁNSKÁ et al., 2006).

A distribuição da HSP70 no citoplasma de oócitos imaturos e maduros não é afetada pela exposição a altas temperaturas e está associada à placa metafásica, indicando uma possível estabilização desta estrutura (KAWASKY; KING, 2001).

No sistema de maturação *in vitro* em suíno, as concentrações de HSP70 diminuem após seis horas de cultivo a 39°C. Na ausência de células do cumulus esta diminuição é aproximadamente de um terço das concentrações iniciais (LÁNSKÁ et al., 2006).

2.3 FECUNDAÇÃO *IN VITRO* (FIV)

Após o desenvolvimento de vários protocolos de FIV por diferentes grupos de pesquisa, os índices de embriões que atingem o estágio de blastocisto são de 20 a 30%. Neste aspecto a espécie suína apresenta dois problemas que precisam ser resolvidos: os altos índices de polispermia e os baixos índices e qualidade dos blastocistos produzidos *in vitro*, quando comparadas aos *in vivo* (GIL et al., 2004).

A principal razão da ocorrência da polispermia parece ser um grande número de espermatozoides no local da FIV, juntamente com a falta do efeito da regulação do aparelho reprodutor feminino para controlar a quantidade e a qualidade dos espermatozoides no local de fertilização. Outra razão é a capacidade insuficiente de oócitos maturados *in vitro* em bloquear polispermia que inclui reação retardada ou incompleta da zona pelúcida, possivelmente causadas pela falta de exposição do oócito ao fluido de oviduto (FUNAHASHI, 2003).

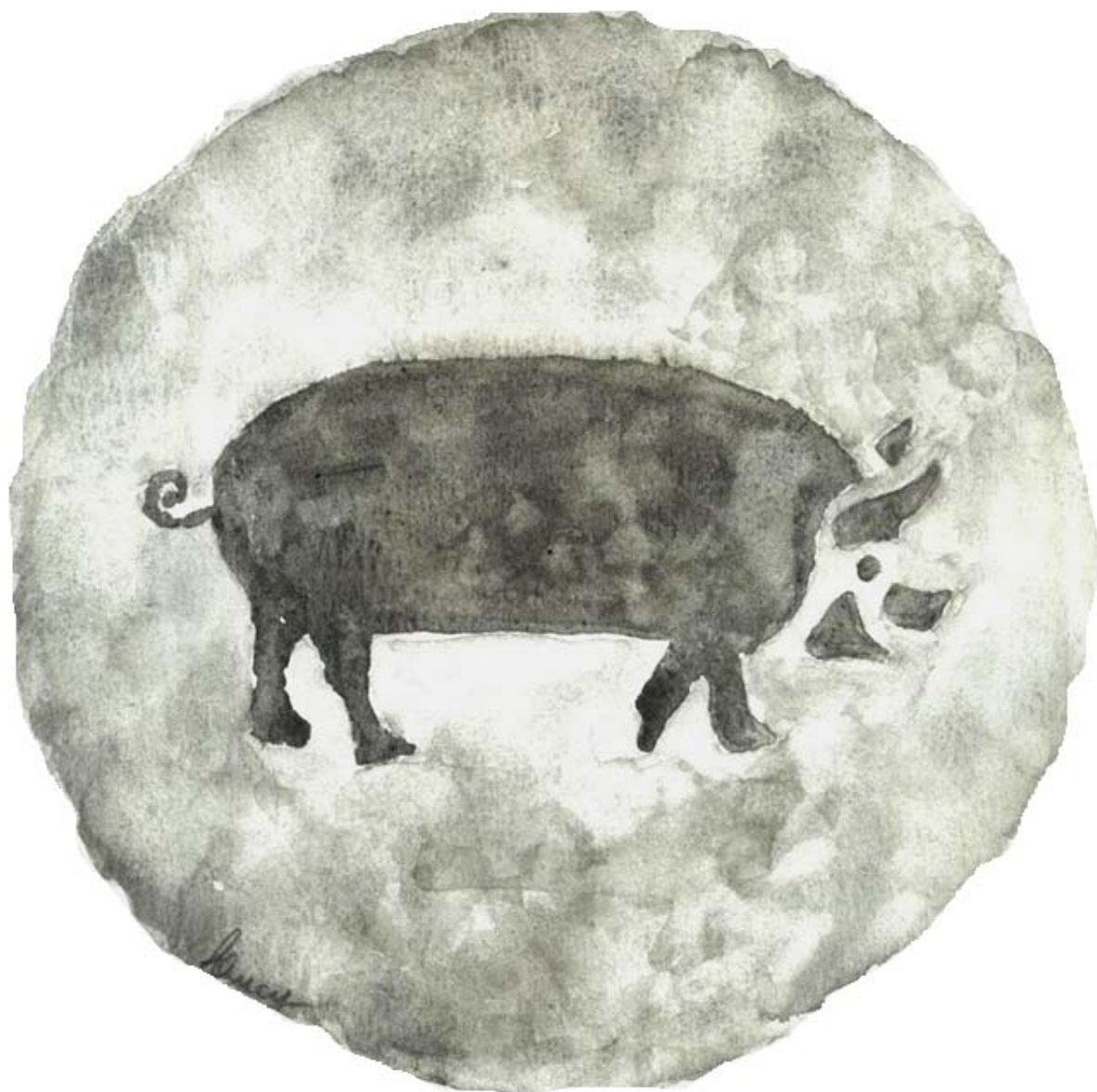
Sonfai et al. (2008) relataram que uma grande proporção de blastocistos resultantes de fecundação polispérmica se tornaram embriões diplóides, sugerindo que a correção da ploidia do embrião pode ocorrer durante o desenvolvimento embrionário, provavelmente logo após a fecundação. No entanto foi observada uma alta frequência de fragmentação em embriões polispérmicos durante o desenvolvimento embrionário precoce.

2.4 CULTIVO DE EMBRIÕES *IN VITRO*

O meio de cultivo NCSU23 é o mais comumente utilizado para a produção *in vitro* de embriões em suínos. Ultimamente, vem aumentando o uso do meio PZM3 (*Porcine Zygote Medium*) que é baseado na composição do fluido do oviduto de suínos, suplementado com aminoácidos, podendo ser uma alternativa para o desenvolvimento de embriões até o estágio de blastocisto (YOSHIOKA et al., 2002).

A baixa tensão de oxigênio na maturação, fecundação e cultivo *in vitro* de oócitos em suínos foi benéfica no desenvolvimento e no aumento do número de células quando empregada no cultivo de embriões no meio NCSU37 (KARJA et al., 2004).

Em estudos realizados por Im et al. (2004) os autores verificaram que o uso de 5% de O₂ no cultivo de embriões produzidos por transferência nuclear e cultivados no meio NCSU23 aumentou o número de células dos embriões (19,4 blastômeros) quando comparados com os produzidos em atmosfera com 20% de O₂ (12,2 blastômeros).



HIPÓTESE E OBJETIVOS

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESE

O uso de baixa tensão de oxigênio (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂) otimiza as condições do sistema de maturação oocitária *in vitro* em meio quimicamente definido (PVA), elevando a eficiência deste sistema a índices semelhantes ao do meio de maturação suplementado com PFF.

3.2 OBJETIVOS

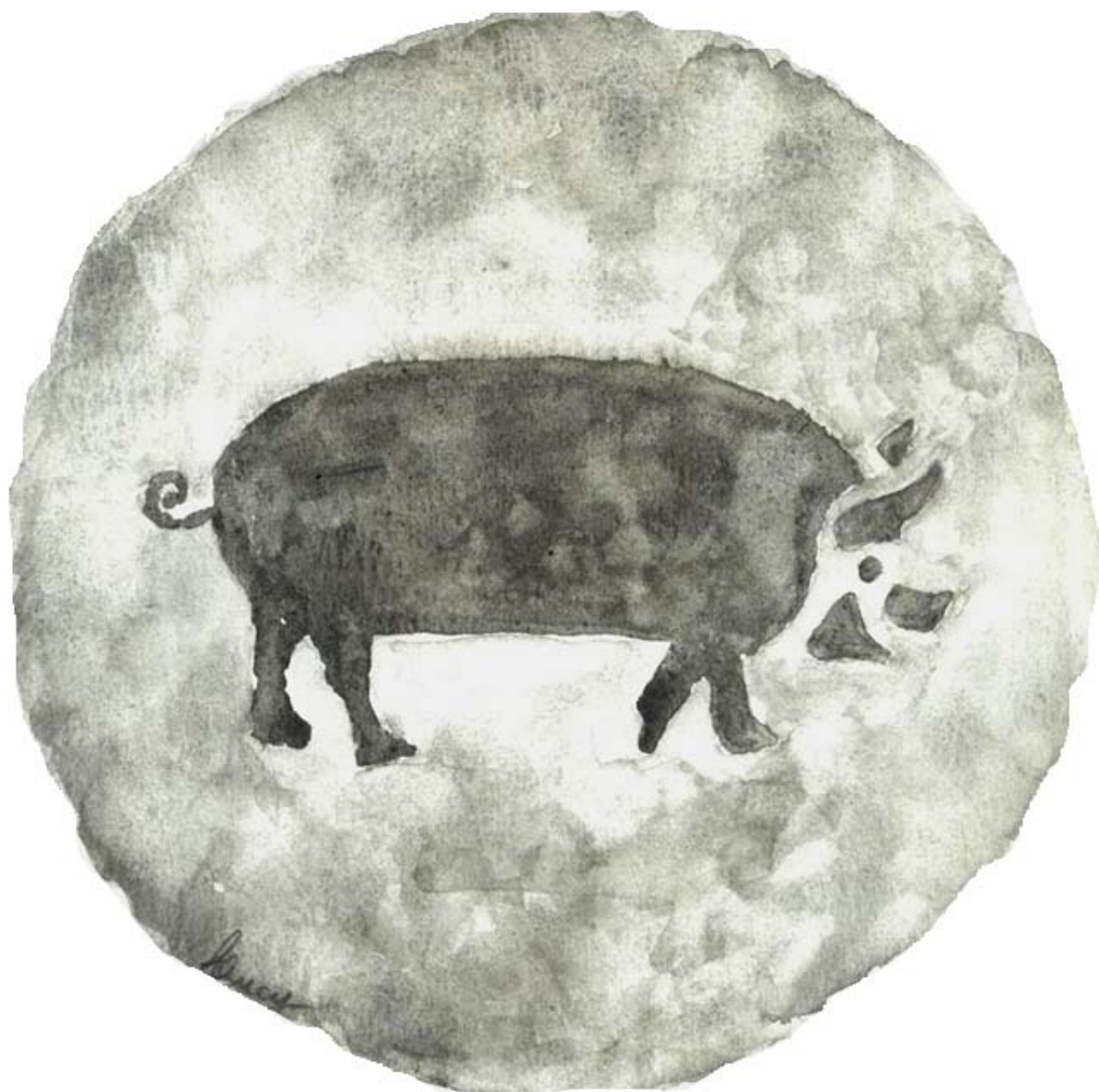
Avaliar os efeitos da baixa tensão de oxigênio e da suplementação no meio de maturação oocitária (10% de PFF ou 0,1% de PVA), sendo para isso avaliados nos oócitos:

- A migração dos grânulos corticais.
- A concentração e distribuição da proteína HSP70.
- A maturação nuclear.
- As concentrações intracelulares da glutathione reduzida dos oócitos.
- Avaliação dos índices de penetração espermática.
- O desenvolvimento de embriões pós fecundação *in vitro*.

Avaliar os efeitos da baixa tensão de oxigênio e da suplementação no meio de maturação oocitária (10% de PFF ou 0,1% de PVA), sendo para isso avaliados no sistema de maturação:

- Ciclo celular das células do cumulus.
- Número de células do cumulus por oócitos.
- As concentrações intracelulares da glutathione reduzida das células do cumulus.

- As concentrações de TBARS no meio de maturação.
- Resistência das células do cumulus ao estresse oxidativo



4 MATERIAL E MÉTODO

O presente experimento foi conduzido em conformidade com as normas éticas do emprego de animais em experimentos, segundo julgamento da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP.

4.1 COLHEITAS DOS OÓCITOS

Para a realização deste experimento foram utilizados oócitos colhidos *in vitro* e *in vivo*.

4.1.1 Colheita dos oócitos para maturação vitro.

Os ovários foram colhidos em matadouro localizado na cidade de Carapicuíba, SP. Após a colheita, os ovários foram imediatamente lavados 2 vezes em solução fisiológica (0,9% NaCl) e transportados em recipiente térmico à temperatura entre 30 e 35°C para o laboratório que se localiza a uma distância de 20km.

No laboratório, os ovários foram lavados em solução fisiológica a 36°C, fixados com pinça hemostática e os folículos incisados com bisturi, sendo todo o líquido proveniente destes folículos recolhido por em copo de Becker contendo 40mL de meio de lavagem de oócitos HBT (Anexo A). Ao término das incisões, o ovário foi mergulhado no meio, agitado suavemente e pressionado contra a parede do Becker para melhor recuperação do conteúdo folicular. O fluido então transferido para tubos cônicos de 50mL para a sedimentação dos oócitos por um período de 10 minutos

No fluxo laminar, o sobrenadante foi removido com auxílio de pipeta sorológica de 20ml e o sedimento ressuspendido em meio HBT e distribuído em placas de Petri descartáveis de 100mm. Os oócitos foram localizados em esteromicroscópio e

transferidos para placas de Petri de 35mm contendo 2mL de meio HBT, sendo selecionados e avaliados morfológicamente, quanto à homogeneidade do citoplasma (granulações finas e homogêneas) e conformação das células do cumulus (mínimo de três camadas de células do cumulus compactas e completas). Oócitos que possuíam estas características foram lavados 1 vez em meio HBT e divididos então nos grupos experimentais:

- Grupo 0 hora: oócitos imaturos nos quais foram avaliadas as condições dos oócitos antes da maturação;
- Grupo PVA 5% de O₂: os oócitos foram lavados em meio de maturação TCM199 suplementado com 0,1% de PVA (Anexo B). Em seguida, grupos de 20 a 25 oócitos foram transferidos para microgotas de 100µL de meio de maturação sob óleo mineral em placa de Petri de 35mm. Os oócitos foram maturados em estufa úmida a 38,5°C em atmosfera contendo baixa tensão de oxigênio (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂);
- Grupo PVA 20% de O₂: os oócitos foram lavados em meio de maturação TCM199 suplementado com 0,1% de PVA (Anexo B). Em seguida, grupos de 20 a 25 oócitos foram transferidos para microgotas de 100µL de meio de maturação sob óleo mineral em placa de Petri de 35mm. Os oócitos foram maturados em estufa úmida a 38,5°C em atmosfera contendo altas tensões de oxigênio (5% de CO₂ em ar, aproximadamente 20% O₂);
- Grupo PFF 5% de O₂: os oócitos foram lavados em meio de maturação TCM199 suplementado com 10% de PFF (Anexo B). Em seguida, grupos de 20 a 25 oócitos foram transferidos para microgotas de 100µL de meio de maturação sob óleo mineral em placa de Petri de 35mm. Os oócitos foram maturados em estufa úmida a 38,5°C em atmosfera contendo baixa tensão de oxigênio (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂);
- Grupo PFF 20% de O₂: os oócitos foram lavados em meio de maturação TCM199 suplementado com 10% de PFF (Anexo B). Em seguida, grupos de 20 a 25 oócitos foram transferidos para microgotas de 100µL de meio de maturação sob óleo mineral em placa de Petri de 35mm. Os oócitos foram maturados em estufa úmida a 38,5°C em atmosfera contendo altas tensões de oxigênio (5% de CO₂ em ar, aproximadamente 20% O₂).

Depois de decorridas 22 horas de maturação, os oócitos foram transferidos para microgotas das respectivas atmosferas e meios de maturação sem hormônios, nos quais permaneceram por mais 22 horas.

Às 0 (grupo 0 hora) e 44 horas de maturação, as células do cumulus dos oócitos de todos os grupos foram removidas mecanicamente com auxílio de micropipeta acoplada a um aspirador bucal, sendo então avaliadas: a migração dos grânulos corticais (item 4.2.1), a quantificação e localização da proteína HSP70 (item 4.2.2), a maturação nuclear (item 4.2.3), a concentração de glutatona reduzida (item 4.2.4), os índices de fecundação *in vitro* (item 4.2.5) e o desenvolvimento embrionário (4.2.6).

As células do cumulus retiradas dos oócitos foram armazenadas, após cálculo do número de células de cada grupo, para avaliação da avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo (item 4.3.1), número de células do cumulus por oócito (item 4.3.2), concentrações de glutatona reduzida (item 4.3.3) e avaliação da resistência ao estresse oxidativo (item 4.3.4).

O meio das microgotas no qual os oócitos foram maturados *in vitro* também foi armazenado a -20°C para avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – (TBARs) (item 4.2.5).

4.1.2 Colheita dos oócitos maturados *in vivo*

Marrãs provenientes do plantel da Fazenda Sertãozinho Ltda (Botelhos, MG), com aproximadamente 110kg e 5 meses de idade foram superovuladas com 1000UI IM de eCG (Folligon®, Intervet, Boxmeer, Holanda) e 3 dias depois 750UI IM de hCG (CHORULON®, Intervet). Os oócitos foram coletados aproximadamente 40 horas após administração do indutor de ovulação (hCG).

Os animais foram abatidos no Frigorífico Nossa Senhora da Saúde (Poços de Caldas - MG). Antes da eletronarçose, foram introduzidas pipetas de inseminação do tipo *Golden Pig*® preenchidas com silicone na cérvix das marrãs a fim de evitar a entrada de líquido no útero durante a escalda. O trato reprodutivo foi coletado e

levado ao laboratório de Reprodução Animal da Pontifícia Universidade Católica (PUC) Poços de Caldas em sacos plásticos acondicionados em caixas de isopor.

Os cornos uterinos foram dissecados para evidenciar os ovidutos. Estes foram separados do restante do útero. Os oócitos maturados *in vivo* foram coletados por lavagem dos ovidutos com 10 mL de solução salina tamponada de fosfato (*Phosphate Buffered Saline* - PBS - Nutricell, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 1% de soro fetal bovino (SFB - Nutricell, Campinas, SP, Brasil). Para isso, uma sonda plástica foi introduzida na região do infundíbulo e o líquido injetado no oviduto com auxílio de seringa. O lavado foi coletado em placas de Petri de 100mm e observado em estereomicroscópio para recuperação dos oócitos.

Os oócitos coletados *in vivo* foram utilizados para comparação com os oócitos maturados *in vitro*, visando assim avaliar a competência dos oócitos após a maturação *in vitro*.

Os oócitos coletados *in vivo* foram processados da mesma forma aos maturados *in vitro* e destinados a avaliações da migração dos grânulos corticais (item 4.2.1), a quantificação e localização da proteína HSP70 (item 4.2.2) e determinação da concentração de glutatona (item 4.2.4). As células do cumulus dos oócitos maturados *in vivo* não foram armazenadas, pois os oócitos recuperados possuíam poucas células, provavelmente pelo fato destas terem sido destacadas do oócito no processo de migração deste até o oviduto.

4.2 AVALIAÇÕES DA MATURAÇÃO OOCITÁRIA

4.2.1 Avaliação da migração dos grânulos corticais

Após a retirada das células do cumulus os oócitos provenientes dos grupos maturados *in vitro* e *in vivo* foram fixados em paraformaldeído¹ 4% por 1 hora e

¹ Sigma cat nº 19210

lavados 3 vezes em 1mg/mL de polivinil pirrolidona (PVP²) em PBS sem cálcio e magnésio (PBS – PVP) à temperatura ambiente. Para a permeabilização, os oócitos foram incubados por 10 minutos em PBS – PVP contendo 0,1% de Triton³ 100X.

Para a marcação dos grânulos corticais, após a lavagem em PVP – PBS, os oócitos foram incubados em 100µg/mL de FITC-PNA (*peanut agglutinin*) conjugada ao isotiocianato de fluoresceína⁴ (Sigma[®]) em PBS – PVP por 30 minutos. Em seguida, os oócitos foram incubados por 30 minutos em 10µg/mL de RNase A⁵ e 10 minutos em 10µg/mL de Iodeto de Propídio⁶ em PBS – PVP para marcação dos núcleos. Após este procedimento, os oócitos foram lavados em PBS – PVP e colocados entre lâmina e lamínula em microgotas de meio de montagem DABCO⁷ (23mg/mL). Todo o procedimento foi realizado em temperatura ambiente.

Em cada manipulação, um grupo de oócitos foi permeabilizado e incubado em 10µg/mL de Iodeto de Propídio em PBS – PVP, por 10 minutos, sendo utilizado como um controle negativo. Este procedimento também foi realizado em temperatura ambiente.

Para análise dos grânulos corticais foi necessário que os oócitos mantivessem o formato esférico mesmo depois de colocados entre lâmina e lamínula. Desta forma, pôde-se avaliar o exato plano equatorial do oócito, pois qualquer perda na estrutura tridimensional poderia alterar a análise. Para que a estrutura oocitária fosse mantida, as lâminas foram montadas conforme descrito no esquema da figura 3.

² Sigma cat nº P0930

³ Sigma cat nº T9284

⁴ Sigma cat nº FL1071

⁵ Sigma cat nº FL1071

⁶ Sigma cat nº P4170

⁷ Sigma cat nº D2522

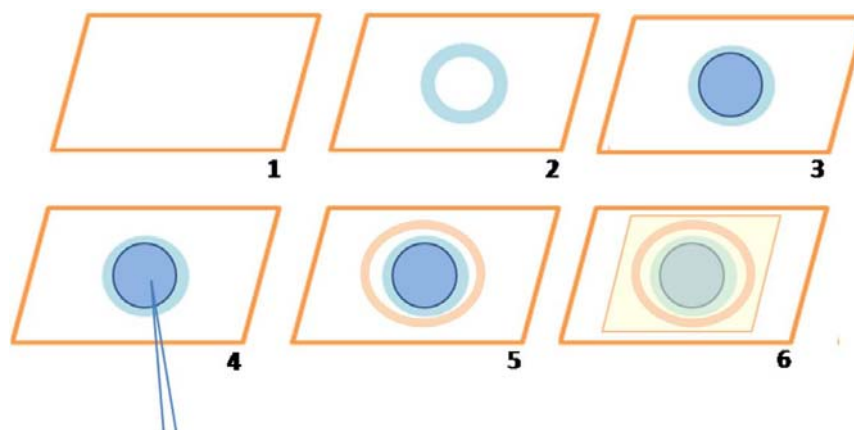


Figura 3 - Esquema de montagem dos oócitos para análise em microscópio confocal. Lâmina (1). Deposição circular da solução de parafina/vaselina (2). O sistema é preenchido com DABCO (3). Os oócitos são depositados no centro (4). Ao redor da parafina/vaselina foi colocada uma fina camada de cola (Araldite®) (5). O sistema foi finalizado com a deposição delicada de uma lamínula (6).

Após a montagem das lâminas, estas foram armazenadas a 4°C até o momento da avaliação por microscopia confocal (Zeiss LSM 510 Meta). Para avaliação da fluorescência FITC foi utilizado o laser íon – argon ajustado para menos de 560nm. Para o Iodeto de Propídio foi utilizado o laser de hélio – íon neon para mais de 560nm.

Foram realizadas 5 repetições, sendo observados 130 oócitos, distribuídos nos seis grupos experimentais: 0 hora, PVA 5% de O₂, PVA 20% de O₂, PFF 5% de O₂, PFF 20% de O₂ e maturados *in vivo* (20 – 23 oócitos por grupo).

As imagens foram obtidas com objetiva de 40X e secção Z seriada de 1.9µm de cada oócito. Cada série de imagens foi avaliada para estabelecer a imagem que correspondia ao plano equatorial de cada oócito. Estas imagens foram analisadas utilizando o software de análise de imagens Image J 1.40g® quanto à área e quantidade de pixels (Integrated Density). Para cada oócito foram feitas duas medidas concêntricas, uma considerando a área total do oócito e outra com 80% dessa área. Para obter a quantificação de pixels do halo externo de 20% foi feita a subtração destas medidas.

4.2.2 Quantificação e localização da proteína HSP70 nos oócitos

A avaliação da proteína HSP70 foi realizada seguindo o protocolo descrito por Kawarsky e King (2001).

Após a fixação por 1 hora em paraformaldeído 4%, os oócitos foram incubados por 1 hora em PBS sem cálcio e magnésio, contendo 2% de soro de cavalo⁸ (PBS – SC) e 0,1% de Triton 100X para o bloqueio de sítios inespecíficos e a permeabilização. Os oócitos foram lavados 3 vezes em PBS – SC e em seguida foram incubados com o anticorpo primário policlonal anti HSP70 humano produzido em coelho⁹ (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) na diluição 1:40 em PBS – SC por 1 hora.

Foram lavados em PBS com 0,05% de Tween-20¹⁰ (PBS - Tween) e incubados 1 hora com anticorpo monoclonal secundário SC2090 produzido em jumento conjugado ao isotiocianato de fluoresceína – FITC¹¹ (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) diluído 1:100 em PBS - SC. Os oócitos foram lavados em PBS - Tween e incubados por 30 minutos em 10µg/mL de RNase A em PBS - PVP. Os núcleos foram marcados 10µg/mL de Iodeto de Propídio em PBS - PVP por 10 minutos, lavados novamente em PBS - Tween e depois em PBS somente.

Para realização do controle negativo, em cada manipulação um grupo de oócito foi incubado somente com o anticorpo monoclonal secundário SC2090 produzido em jumento conjugado ao isotiocianato de fluoresceína – FITC (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) diluído 1:100 em PBS – SC.

Para a validação da especificidade do anticorpo utilizado foi induzido o estresse oxidativo em um grupo de oócitos com 0 hora de maturação. Para isso os oócitos foram incubados 1 hora em solução contendo 100µl de PBS, 25µl de solução 20mM de ácido ascórbico¹², 25µl de solução 4 mM de sulfato de ferro¹³ e 10µl de solução contendo 20µl de t-butil-hidroperóxido¹⁴ e 8670µl de peróxido de

⁸ Gibco cat nº 26050070

⁹ Santa Cruz Biothechnology cat nº sc1060

¹⁰ Sigma cat nº P1379

¹¹ Santa Cruz Biothechnology cat nº sc2090

¹² Sigma cat nº A4034

¹³ Sigma cat nº F8263

¹⁴ Sigma cat nº B2633

hidrogênio¹⁵. Após este período, os oócitos foram fixados e então realizado o procedimento de imunohistoquímica como descrito anteriormente.

Os oócitos foram colocados entre lâmina e lamínula, seguindo o protocolo descrito no item 4.2.1. Após a montagem das lâminas, estas foram armazenadas a 4°C até o momento da avaliação por microscopia confocal (Zeiss LSM 510 Meta), utilizando-se os mesmos lasers e valores de excitação e emissão de comprimento de onda.

O experimento foi realizado em 5 replicatas, sendo observados 180 oócitos, distribuídos nos sete grupos experimentais: 0 hora, PVA 5% de O₂, PVA 20% de O₂, PFF 5% de O₂, PFF 20% de O₂, maturados *in vivo*, sendo utilizado 24 – 30 oócitos por grupo.

Para avaliação do estresse induzido, foram realizado em 5 replicatas, sendo observados 45 oócitos, distribuídos em dois grupos experimentais: 0 hora e estresse induzido, sendo utilizado 20 – 25 oócitos por grupo.

As análises foram realizadas com objetiva de 40X. Em 5 oócitos de cada grupo foi realizada a secção Z seriada de 1,9µm, para verificar a localização da proteína. Estas imagens foram analisadas utilizando o software de análise de imagens Image J 1.40g® e avaliadas quanto à área e quantidade de pixels (Integrated Density).

4.2.3 Avaliação da maturação nuclear

A avaliação da maturação nuclear foi realizada nos grupos maturados *in vitro* (PVA 5% de O₂, PVA 20% de O₂, PFF 5% de O₂ e PFF 20% de O₂). Para tanto, os núcleos das células foram pela marcados com 10µg/mL de Iodeto de Propídio em PBS - PVP por 10 minutos. Esta avaliação foi realizada nos mesmos oócitos nos quais foram realizadas as avaliações de migração dos grânulos corticais e de quantificação e localização da HSP70.

¹⁵ Merck cat nº 107210.1000

Foram realizadas 10 repetições, sendo observados 200 oócitos, distribuídos nos quatro grupos experimentais: PVA 5% de O₂, PVA 20% de O₂, PFF 5% de O₂, PFF 20% de O₂ (45 - 52 oócitos por grupo).

4.2.4 Avaliação das concentrações de glutathiona reduzida (GSH)

Após a retirada das células do cumulus, 25 oócitos dos Grupos experimentais 0 hora, PVA 5% de O₂, PVA 20% de O₂, PFF 5% de O₂, PFF 20% de O₂ e maturados *in vivo* foram lavados 3 vezes em tampão de estoque (0,2M de PBS sem cálcio e magnésio com 10mM de EDTA¹⁶), colocados em tubos cônicos de centrifuga de 0,65μl e adicionados 5μL de tampão de estoque e 5μL de solução de 1,25M de H₃PO₄¹⁷. As amostras de oócitos foram armazenadas à -80°C até o momento da análise.

As concentrações de glutathiona foram determinadas pelo ensaio do ciclo da glutathiona redutase-5,5'-dithio-bis ácido 2-nitrobenzóico (DTNB-GSSG) de acordo com as instruções do kit comercial Glutathione Assay Kit Sigma®¹⁸. O produto da reação de coloração amarela foi mensurado por 10 leituras com intervalos de 1 minuto em leitor de Elisa (Amersham Pharmacia®) em comprimento de onda de 412nm. Após cinco minutos de análise não houve aumento da absorbância. Este momento foi utilizado para análise de todas as amostras.

Para a análise dos resultados, uma análise padrão foi realizada, sendo que para essa análise, concentrações conhecidas de GSH foram utilizadas (Figura 4). Para cada avaliação das amostras de uma manipulação, conjuntamente foram aferidas as emissões de valores conhecidos de glutathiona (0,0156nmol; 0,0321nmol; 0,0625nmol; 0,125 nmol). Com estes valores foi construída uma reta e respectiva equação. Ao se extrapolar os valores de emissão obtidos das amostras de oócitos a esta equação foi possível obter as concentrações de glutathiona das amostras avaliadas.

Foram realizadas 5 repetições com 25 oócitos por tratamento, totalizando 750 oócitos. As concentrações de glutathiona reduzidas obtidas na leitura foram divididas pelo

¹⁶ Sigma cat nº E5134

¹⁷ Sigma cat nº A1035

¹⁸ Sigma cat nº CS0260

número de oócitos da amostra para determinação das concentrações de GSH por oócito.

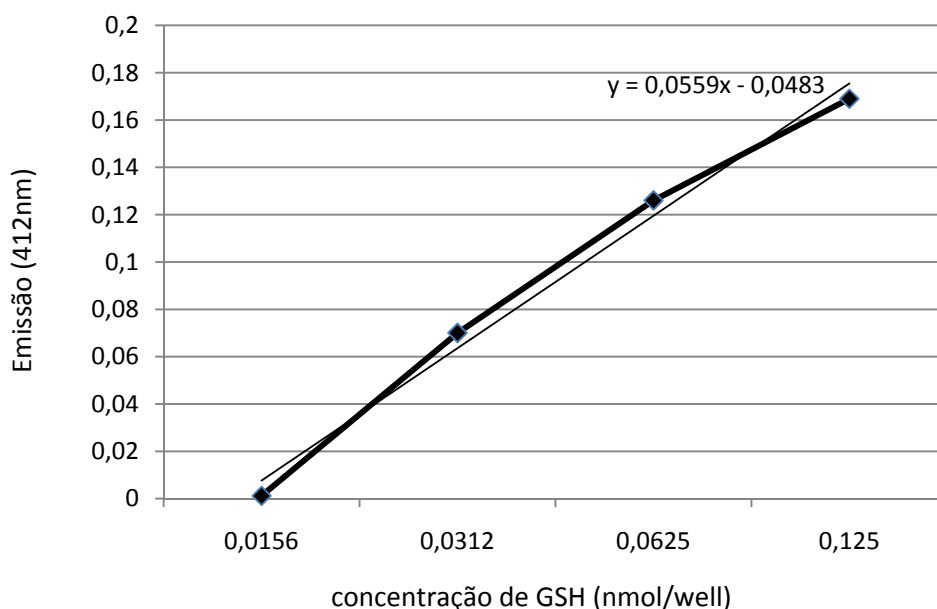


Figura 4 - Exemplo de reta padrão construída com concentrações conhecidas de GSH, utilizada para a conversão (emissão para concentração) de valores obtidos das amostras de oócitos

4.2.5 Fecundação *in vitro* (FIV) e avaliação dos índices de penetração espermática

A fração rica do sêmen foi colhida pelo método da mão enluvada. Após a colheita, o sêmen foi diluído na proporção de 10mL de Beltsville Thawing Solution® (BST) para 5mL de sêmen e armazenado entre 15 e 18°C por 24 horas. No dia da FIV, o sêmen foi aquecido a 37°C e centrifugado por 700 x g por 3 minutos.

Em seguida, 200µL do sedimento de sêmen foram depositados delicadamente na superfície do gradiente de Percoll (90% e 45% - Anexo C), sendo centrifugado por 4 minutos a 9000 x g para separação dos espermatozóides vivos. Após a centrifugação, 100µL do sedimento foram retirados e centrifugados (3 minutos a 9000 x g) em 3mL meio de fecundação mTBM (Anexo D) para remoção do meio do gradiente de Percoll.

Para a inseminação, foram determinadas a motilidade e a concentração espermática, sendo os espermatozóides diluídos em meio mTBM, para atingir a concentração final de 5×10^5 espermatozóides/mL na microgota de fecundação.

Após o período de maturação e remoção das células cumulus, os oócitos dos grupos PVA 5% de O₂, PVA 20% de O₂, PFF 5% de O₂, PFF 20% de O₂ foram lavados três vezes em meio de fecundação e colocados em microgotas de 100µL sob óleo mineral. Em seguida, 4µL da suspensão de espermatozóides foi adicionada a cada microgota com os oócitos, sendo mantidos em estufa a 38,5°C; 5% de CO₂ em ar e alta umidade. Após 30 minutos, os oócitos de cada grupo foram delicadamente lavados em meio mTBM para remoção dos espermatozóides não aderidos a zona pelúcida e colocados em uma nova microgota de 100µL de meio mTBM sem espermatozóides por mais 5 horas e meia, sendo mantidos em estufa à 38,5°C; 5% de CO₂ em ar e alta umidade.

Após 6 horas da inseminação, os presumíveis zigotos foram lavados 3 vezes em meio de cultivo PZM3 (Anexo E) e colocados em microgotas de 100µL deste meio sob óleo mineral para cultivo por 7 dias.

Foram realizadas 8 repetições, sendo observados 625 oócitos, distribuídos nos quatro grupos experimentais: PVA 5% de O₂, PVA 20% de O₂, PFF 5% de O₂, PFF 20% de O₂ (155 - 158 oócitos por grupo).

Após 18 horas de cultivo, parte dos presumíveis zigotos teve a zona pelúcida removida com solução de pronase¹⁹ (8mg/mL). Os oócitos sem zona pelúcida foram lavados em TCM199 contendo 10%SFB para a neutralização da ação da pronase, colocados entre lâmina e lamínula em microgota com 10µg/mL de Hoechst 33342²⁰ em glicerol²¹ e avaliados em microscópio (Zeiss) equipado com epifluorescência (filtro de excitação máxima de 365nm e emissão máxima de 480nm).

Desta forma foi possível a visualização e a contagem dos pronúcleos. Foram considerados monospermicos zigotos contendo somente 2 pronúcleos e o primeiro e segundo corpúsculos polares. Enquanto que zigotos com formação de mais de dois pronúcleos foram considerados polispermicos. Os que não apresentam a formação de pelo menos dois pronúcleos foram considerados não fecundados.

¹⁹ Sigma cat nº P6911

²⁰ Sigma cat nº B2261

²¹ Sigma cat nº G5516

Foram realizadas 6 repetições, sendo observados 120 oócitos, distribuídos nos quatro grupos experimentais: PVA 5% de O₂, PVA 20% de O₂, PFF 5% de O₂, PFF 20% de O₂ (27 - 31 oócitos por grupo).

4.2.6 Cultivo *in vitro* e avaliação do número e viabilidade de blastômeros

Decorridas 6 horas da FIV, os presumíveis zigotos foram lavados 3 vezes em meio PZM3 (Anexo E) e colocados em microgotas de 100µL deste meio sob óleo mineral para cultivo por 7 dias. Após 18 horas de cultivo, parte dos zigotos foi retirada para avaliação dos índices de polispermia (item 4.2.5). No terceiro e quinto dias após a fecundação *in vitro*, foram acrescentados à microgota de cultivo 45µL do meio PZM3 (“feeding”). Os embriões foram cultivados em atmosfera contendo 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂, em estufa a 38,5°C e alta umidade. O desenvolvimento embrionário foi avaliado pelos índices de clivagem e de blastocisto nos dias 3 e 7 do cultivo, respectivamente.

Foram realizadas 8 repetições, sendo observados 625 zigotos, distribuídos nos quatro grupos experimentais: PVA 5% de O₂, PVA 20% de O₂, PFF 5% de O₂, PFF 20% de O₂ (155 - 158 oócitos por grupo).

No dia 7 de desenvolvimento, os embriões foram corados para determinação do número de células vivas, mortas e em apoptose.

Após 7 dias de cultivo, os embriões foram lavados 3 vezes em PBS - PVP e incubados por 30 minutos em solução contendo as sondas fluorescentes: 5 µg/ml de Hoechst 33342 (para avaliação do número de células totais), 10µg/ml de Iodeto de Propídio (para avaliação do número de células em necrose) e 0,1 µM/ml de Yopro 1²² (para avaliação do número de células em apoptose).

Os embriões foram lavados em PBS - PVP e colocados entre lâmina e lamínula com glicerol. Os embriões foram avaliados em microscópio de epifluorescência (Olympus), sendo utilizados filtros de acordo com o fluorocromo: Hoechst 33342 (excitação máxima de 355nm e emissão máxima de 465nm), Iodeto

²² Gibco cat nº Y3603

de Propídio (excitação máxima de 530nm e emissão máxima de 615nm) e Yopro 1 (excitação máxima de 490nm e emissão máxima de 510nm).

Foram avaliados 70 embriões, distribuídos nos quatro grupos experimentais: PVA 5% de O₂, PVA 20% de O₂, PFF 5% de O₂, PFF 20% de O₂ (13 - 20 embriões por grupo).

4.3 AVALIAÇÕES DO SISTEMA DE MATURAÇÃO OOCITÁRIA

4.3.1 Análise do ciclo celular das células do cumulus por citometria de fluxo

As células do cumulus dos oócitos dos grupos 0 hora, PVA 5% de O₂, PVA 20% de O₂, PFF 5% de O₂ e PFF 20% de O₂ foram armazenadas para análise do ciclo celular. As células do cumulus após a remoção mecânica do oócito foram centrifugadas, a 6000 x g por 4 minutos, o sobrenadante retirado e o sedimento ressuscitado em 200µL de etanol 70% gelado para fixação. As células foram mantidas a - 20°C até o momento da avaliação.

Para a análise, as mesmas foram novamente centrifugadas a 6000 x g por 4 minutos e ressuscitadas em PBS contendo 50µg/mL de Iodeto de Propídio e 0,5mg/mL de RNase A e incubadas por 1 hora a 42°C. Para a retirada da sonda fluorescente, as alíquotas foram centrifugadas a 6000 x g por 4 minutos e ressuscitadas em 300µL de PBS. As amostras foram analisadas utilizando o citrometro de fluxo Guava EasyCyte™, tendo sido avaliados 10000 eventos por réplica. Foram analisadas 3 repetições para cada um dos tratamento analisados.

4.3.2 Número de células do cumulus por oócito

Após a retirada por processo mecânico das células do cumulus dos oócitos dos grupos 0 hora, PVA 5% de O₂, PVA 20% de O₂, PFF 5% de O₂ e PFF 20% de O₂, o meio (PBS – PVP) contendo as células foi centrifugado a 6000 x g por 4 minutos. O sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspensionado em 110µL de PBS, sendo 10µL utilizados para determinação da concentração celular em câmara de Neubauer.

O resultado da concentração de células foi dividido pelo número de oócitos no qual estas estavam aderidas para determinação do número de células por oócito.

As células restantes foram avaliadas quanto às concentrações de glutathiona reduzida (GSH) ou quanto à resistência das células do cumulus ao estresse oxidativo

Foram realizadas 11 repetições, sendo contadas as células provenientes de 1375 oócitos, distribuídos nos cinco grupos experimentais: 0 hora, PVA 5% de O₂, PVA 20% de O₂, PFF 5% de O₂ e PFF 20% de O₂ (250 - 280 oócitos por grupo).

4.3.3 Avaliação das concentrações de glutathiona reduzida (GSH) nas células do cumulus.

Após a retirada de 10µL para determinação da concentração celular, as células foram centrifugadas novamente, o sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspensionado em 5µL de tampão de estoque e 5µL da solução de 1,25M de H₃PO₄. As amostras de oócitos foram armazenadas à -80°C até o momento da análise.

Para as avaliações das concentrações de glutathiona foi utilizado o mesmo protocolo descrito para os oócitos no item 4.2.4. A concentração de glutathiona reduzida obtida na leitura foi dividida pela concentração de células na amostra para determinação das concentrações de GSH por célula.

Foram realizadas 5 repetições, sendo avaliadas as células provenientes de 625 oócitos, distribuídos nos cinco grupos experimentais: 0 hora, PVA 5% de O₂, PVA 20% de O₂, PFF 5% de O₂ e PFF 20% de O₂ (123 - 127 oócitos por grupo).

4.3.4 Avaliação dos TBARS nos meios de maturação

As determinações de TBARS têm como fundamento a reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma molécula de malondialdeído, produzindo um complexo de coloração rósea, que é quantificado por espectrofotometria em comprimento de onda de 532nm. Esta reação ocorre à temperatura entre 90 e 100°C e em pH ácido.

Alíquotas de 100µL do meio de maturação e 200µL de solução de ácido tricloroacético²³ a 10% (TCA 10%) foram centrifugadas por 15 minutos, com temperatura de 15°C e 18.000g para provocar a precipitação de proteínas.

Alíquotas de 150µL do sobrenadante foram colocadas em tubos de ensaio juntamente com 150µL de ácido tiobarbitúrico²⁴ a 1% (TBA, 1%) dissolvido em hidróxido de sódio²⁵ 0,05N, preparado instantes antes de ser utilizado. Os tubos contendo esta mistura foram incubados em banho fervente (100°C) por 10 minutos e resfriados em banho de gelo (0°C).

Os TBARS foram quantificados em espectrofotômetro Ultrospec 3300pro Amersham Pharmacia® em um comprimento de onda de 532nm. Os resultados foram comparados com uma reta padrão, feita previamente com malondialdeído²⁶.

O malondialdeído (MDA) é uma das principais substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico e sendo a concentração dos TBARS determinada utilizando-se o valor $1,56 \times 10^5 \times M^{-1} \text{ mL}^{-1}$ como coeficiente de extinção molar do malondialdeído. A peroxidação lipídica no meio foi expressa em nanogramas de TBARS/mL de meio.

Foram coletados os meios de maturação de 12 manipulações realizadas.

²³ Sigma cat nº T9159

²⁴ Sigma cat nº T5500

²⁵ Sigma cat nº S8045

²⁶ Acros cat nº 156731000

4.3.5 Avaliação da resistência das células do cumulus ao estresse oxidativo

Após a retirada de 10 μ L para determinação da concentração celular, a peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 25 μ l de solução 20mM de ácido ascórbico e 25 μ l de solução 4 mM de sulfato de ferro. A mistura foi incubada por 1,5 horas a 37°C.

Posteriormente, os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram avaliados de acordo com protocolo descrito no item 4.2.5. Esta técnica visa verificar a susceptibilidade de uma amostra ao estresse oxidativo. Assim, uma amostra na qual seja detectado uma quantidade alta de TBARS indica uma amostra com alta susceptibilidade ao estresse oxidativo. A peroxidação lipídica no meio expressa-se em nanogramas de TBARS/mL de meio.

Foram realizadas 6 repetições, sendo avaliadas as células provenientes de 750 oócitos, distribuídos nos cinco grupos experimentais: 0 hora, PVA 5% de O₂, PVA 20% de O₂, PFF 5% de O₂ e PFF 20% de O₂ (140 - 155 oócitos por grupo).

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

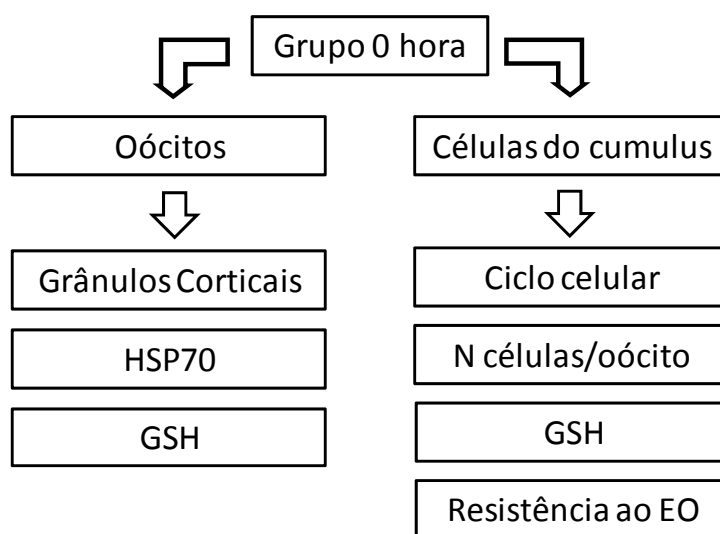


Figura 5 - Esquema das avaliações realizadas nos oócitos e células do cumulus provenientes do grupo 0 hora

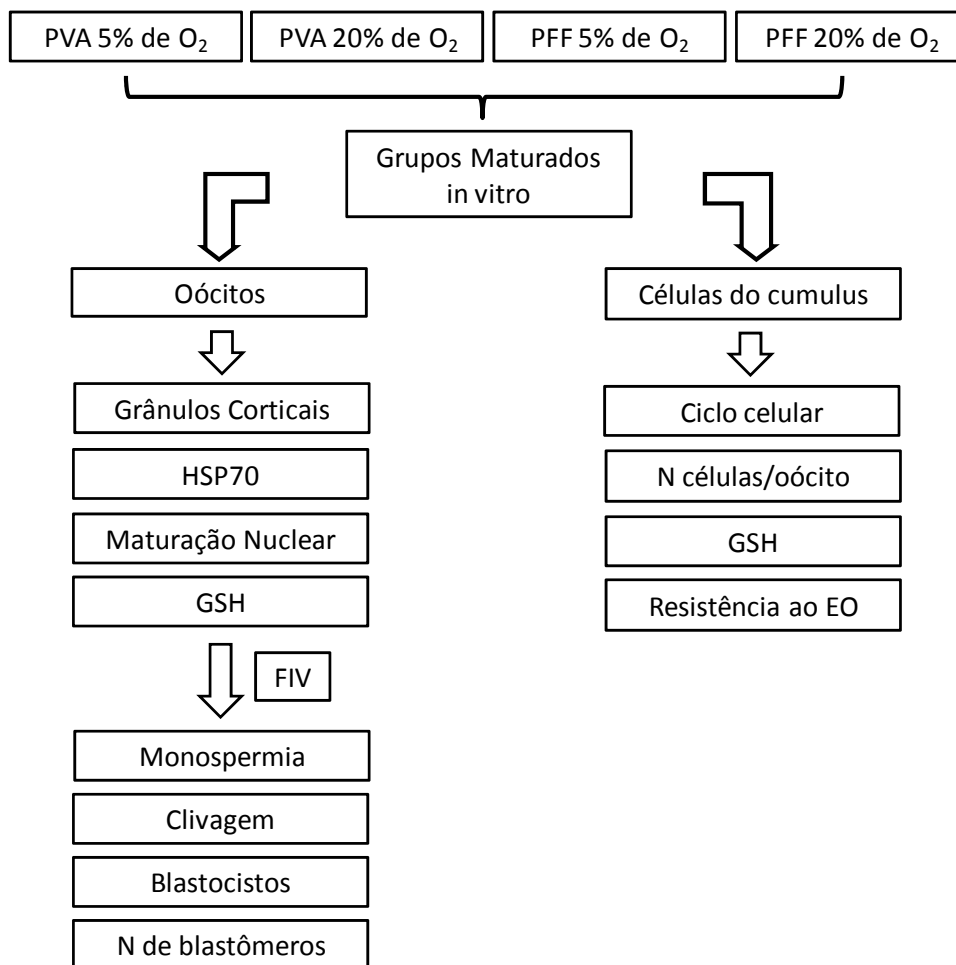


Figura 6 - Esquema das avaliações realizadas nos oócitos e células do cumulus provenientes dos grupos em que foi realizada a maturação *in vitro*

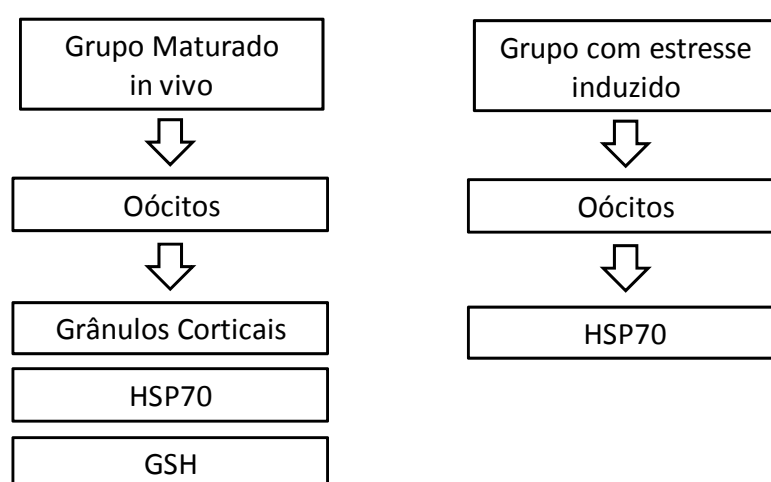


Figura 7 - Esquema das avaliações realizadas nos oócitos provenientes dos grupos em que foi realizada a maturação *in vivo* e o grupo em que foi induzido o estresse oxidativo.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

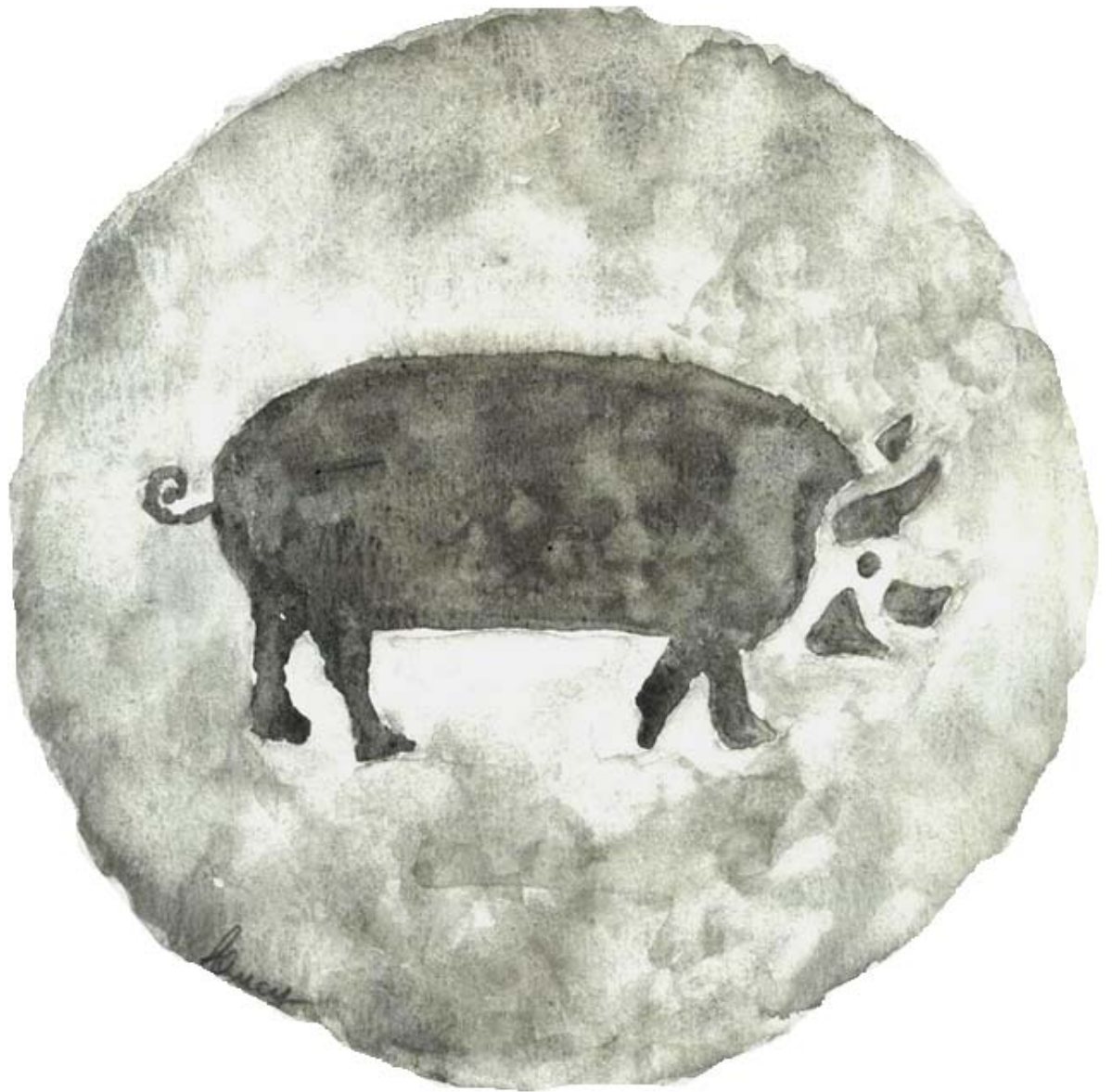
Os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias pelo aplicativo Guided Data Analysis.

As variáveis foram submetidas ao PROC MIXED dos recursos do pacote estatístico SAS, versão 9.1.3 para Windows. Foi utilizado o LSMEANS (média dos quadrados mínimos) para obtenção das médias ajustadas dos tratamentos, com comparações utilizando-se o Teste Tukey.

O nível de significância utilizado para rejeitar H₀ (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para nível de significância menor que 0,05 considerou-se que ocorreram diferenças entre as variáveis classificatórias (atmosfera e suplementação do meio de maturação, interação entre eles) para determinada variável resposta (migração de grânulos corticais, HSP70, maturação nuclear, concentrações de glutatona dos oócitos, porcentagem de clivagem, porcentagem de blastocistos, número de blastômeros, ciclo celular das células do cumulus, número de células por oócito, concentrações de glutatona das células do cumulus, resistência das células ao estresse oxidativo e concentração de TBARS no meio de maturação).

Além disso, foi realizada a comparação de cada grupo de oócitos que passaram pelo processo de maturação *in vitro* (PVA 5% de O₂, PVA 20% de O₂, PFF 5% de O₂, PFF 20% de O₂) com o grupo 0 hora e maturado *in vivo* para as variáveis: migração de grânulos corticais, HSP70, concentrações de glutatona dos oócitos, visando obter dados da qualidade dos oócitos antes do período de maturação e da competência deste oócitos após a maturação *in vitro*. Para variável HSP70, o grupo 0 hora foi ainda comparado com o grupo de oócitos que tiveram o estresse induzido.

Para as avaliações das células do cumulus, também foram comparados individualmente as células provenientes de cada grupo de maturação *in vitro* com o grupo 0 hora nas avaliações de: ciclo celular, número de células por oócito, concentrações de glutatona e resistência das células ao estresse oxidativo.



5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO OOCITÁRIA

5.1.1 Avaliação da migração dos grânulos corticais

A figura 8 ilustra a marcação dos grânulos corticais nos oócitos antes do período de maturação (A) e após a maturação (B). Pode-se observar a migração dos grânulos para a periferia no oócito maturo. Não foi observada marcação nos oócitos utilizados como controle negativo.

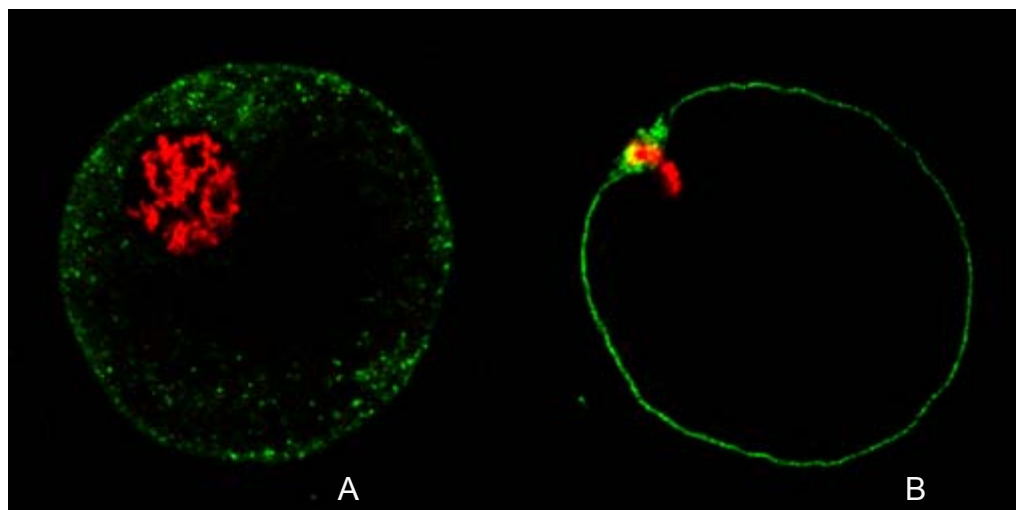


Figura 8 - Marcação dos grânulos corticais (FITC - verde) e da cromatina (Iodeto de propídeo - vermelho). Em A, oócito com grânulos difusos e cromatina em vesícula germinativa. Em B, oócito com grânulos na periferia celular e cromatina em metáfase II

A tabela 1 mostra que não houve interação entre o efeito da atmosfera utilizada (5 ou 20% de O₂) e a suplementação do meio de maturação com 0,1% de

PVA ou 10% de PFF nos índices de migração dos grânulos corticais. Pode-se observar que houve diferença entre as réplicas realizadas.

Tabela 1 - Efeito (p) da réplica, atmosfera, suplementação do meio de maturação e interação entre a atmosfera e a suplementação do meio de maturação nos índices de migração dos grânulos corticais, São Paulo, 2009

	Réplica	Atmosfera	Suplementação	ATxSuple*
p	<0.00001	0,219	0,007	0,525

*ATxSuple – interação da atmosfera e a suplementação do meio de maturação

Na figura 9 observa-se que não foi verificado efeito da atmosfera na migração dos grânulos corticais dos oócitos maturados *in vitro*. Porém, houve efeito da suplementação do meio de cultivo, sendo os oócitos maturados *in vitro* em meio contendo 10% de PFF apresentaram maior concentração de grânulos na periferia oocitária (p = 0,0070).

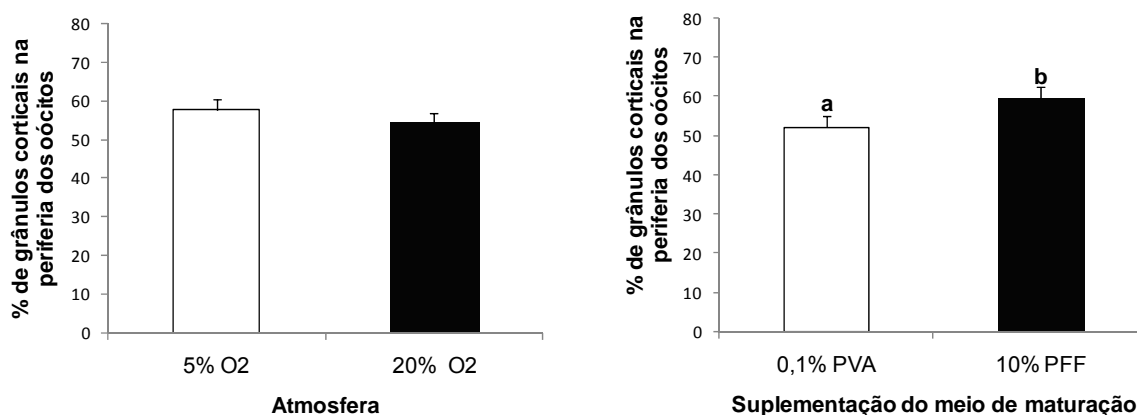


Figura 9 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação na média das porcentagens de grânulos corticais presentes no halo externo de 20% do diâmetro de oócitos maturados *in vitro*. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa (P<0,05). Os dados representam médias dos quadrados mínimos \pm EP

Ao avaliar a migração dos grânulos corticais, observou-se que os grupos maturados *in vitro* PVA 5% de O₂, PFF 20% de O₂ e PFF 5% de O₂ apresentaram

maiores índices de migração que os oócitos 0 hora ($p = 0,0011$; $0,0002$ e $<0,0001$ respectivamente). Ao contrário disto, o grupo maturado *in vivo* e o grupo PVA 20% de O_2 apresentaram resultados semelhantes ao do grupo 0 hora. Foi observado também que os dois grupos maturados em meio suplementado com 10% de PFF apresentaram melhores resultados que o grupo maturado *in vivo* (PFF 5% de O_2 $p = 0,0046$ e 20% de O_2 $p = 0,05$), o que não ocorreu com os oócitos maturados em meio suplementado com 0,1% de PVA (Figura 10).

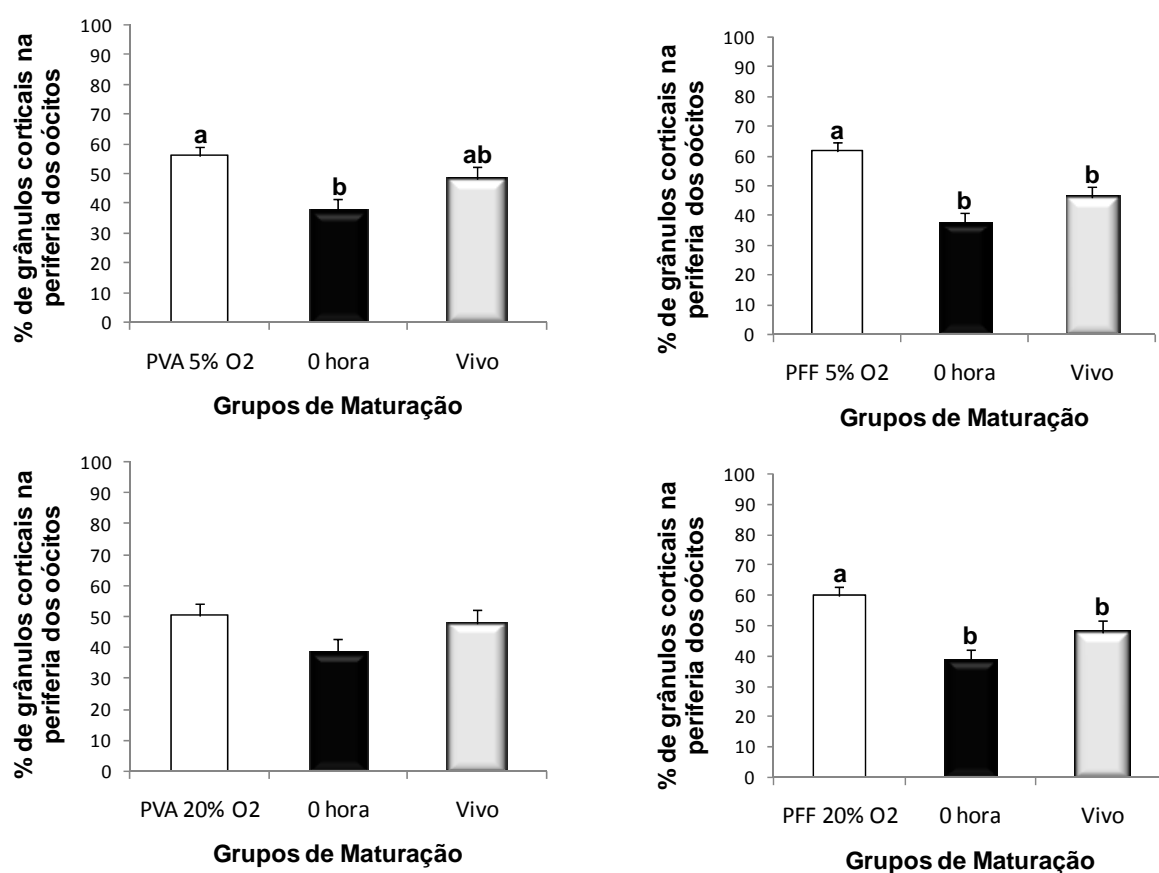


Figura 10 - Médias das porcentagens de grânulos corticais presentes no halo externo de 20% do diâmetro de oócitos antes (0 hora), depois da maturação *in vitro* nos diferentes tratamentos e da maturação *in vivo*. Letras diferentes sobscritas em cada barra representam diferença significativa ($P < 0,05$). Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP

5.1.2 Quantificação e localização da proteína HSP70 nos oócitos

A tabela 2 mostra que houve interação entre o efeito da atmosferas utilizada e a suplementação do meio de maturação oocitária com 0,1% de PVA ou 10% de PFF nos índices de quantificação da proteína HSP70. Pode-se observar que houve diferença entre as réplicas realizadas.

Tabela 2 - Efeito (p) da réplica, atmosfera, suplementação do meio de maturação e interação entre a atmosfera e a suplementação do meio de maturação nos índices de quantificação da proteína HSP70, São Paulo, 2009

	Réplica	Atmosfera	Suplementação	ATxSuple*
p	<0.00001	0,381	0,139	0,012

*ATxSuple – interação da atmosfera e a suplementação do meio de maturação

Na comparação entre os oócitos maturados *in vitro*, o grupo PFF 5% de O₂ não diferiu do grupo PFF 20% de O₂. Entre os grupos suplementados com 0,1% de PVA também não foi verificada diferença. Nos grupos maturados em 5% de O₂, o grupo maturado com meio suplementado com PFF apresentou maiores concentrações de HSP70 (p = 0,0245) e nos grupos maturados em 20% de O₂ não foi verificada diferença (Figura 11).

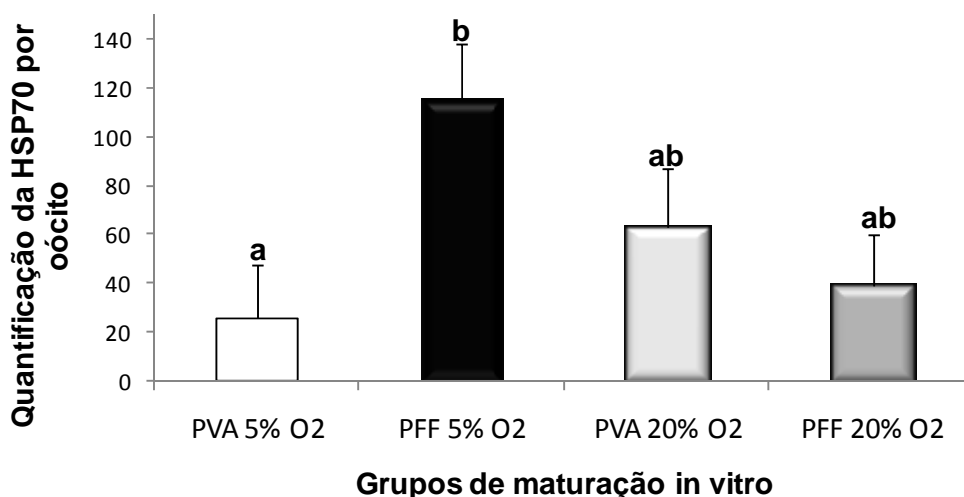


Figura 11 - Média das concentrações de HSP70 (intensidade de pixels x 10⁻⁶) em oócitos maturados *in vitro* nos diferentes tratamentos. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($P < 0,05$). Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP

Os oócitos a 0 hora apresentaram índices maiores de HSP70 que os grupos maturados *in vitro*, ou seja, PVA 5% de O₂ ($p = < 0,0001$), PFF 5% de O₂ ($p = 0,05$), PVA 20% de O₂ ($p = 0,0014$) e PFF 20% de O₂ ($p = 0,0003$) como descrito na figura 12. Observou-se também que os oócitos *in vivo* não diferiu dos oócitos a 0 hora e apresentou maiores índices de HSP70 que os grupos maturados *in vitro*, ou seja PVA 5% de O₂ ($p = < 0,0001$), PFF 5% de O₂ ($p = 0,0013$), PVA 20% de O₂ ($p = < 0,0001$) e PFF 20% de O₂ ($p = < 0,0001$). Não foi verificada diferença entre os índices dos oócitos do grupo 0 hora e maturado *in vivo*.

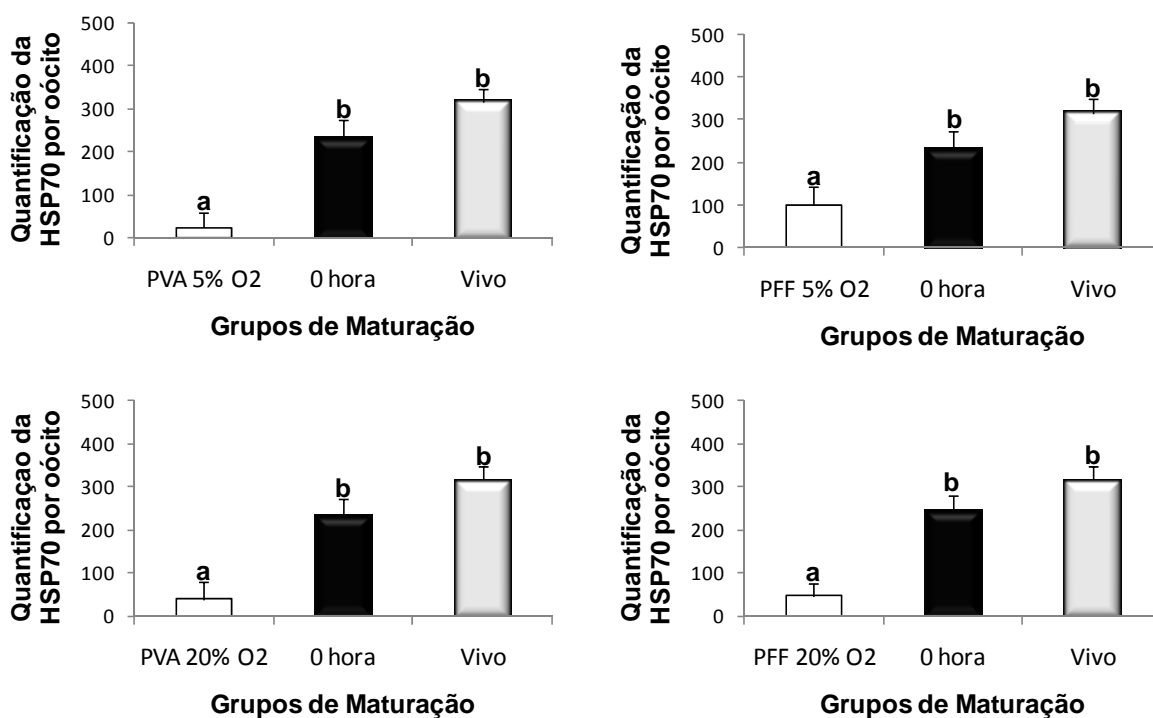


Figura 12 - Média das concentrações de HSP70 (intensidade de pixels $\times 10^{-6}$) de oócitos antes da maturação (0 hora) e depois da maturação *in vitro* nos diferentes tratamentos e da maturação *in vivo*. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($P < 0,05$). Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP

Na figura 13 pode-se observar que o grupo de oócitos ao qual foi induzido estresse oxidativo apresentou maiores índices de HSP que o grupo 0 hora ($p = 0,0017$).

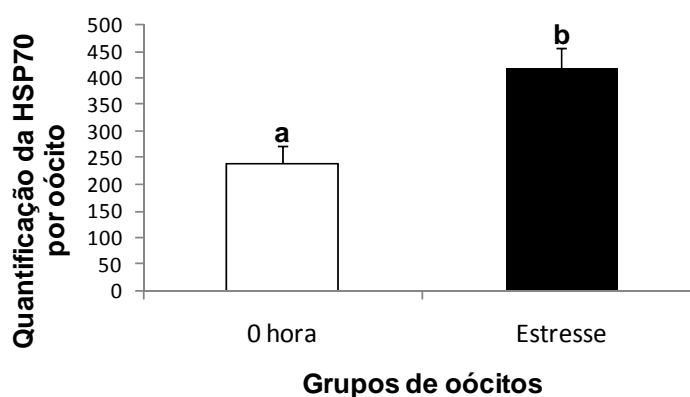


Figura 13 - Média das concentrações de HSP70 (intensidade de pixels $\times 10^{-6}$) de oócitos antes da maturação (0 hora) e após a indução do estresse oxidativo. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($P < 0,05$). Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP

Na avaliação das imagens geradas pela secção seriada do eixo Z, observou-se que nos 5 oócitos avaliados a 0 hora houve distribuição dispersa da HSP70 e que somente em 2 destes oócitos pode-se observar presença nuclear desta proteína. Não foi observada a marcação intensa em torno da cromatina (Figura 14).

Os oócitos após as 44 horas de maturação *in vitro* também apresentaram distribuição dispersa da HSP70. Para nenhum dos grupos foi observada a marcação intensa em torno da cromatina. No entanto, 3 dos 4 oócitos analisados do grupo suplementado com PFF 20% de O₂ apresentaram forte marcação no corpúsculo polar. O mesmo ocorreu com 2 dos 5 oócitos analisados do grupo PFF 5% de O₂. Esta característica de marcação intensa do corpúsculo polar só foi observada em 1 oócito dos 8 analisados nos grupos suplementados com PVA (Figura 14).

Nos oócitos maturados *in vivo* também foi observada distribuição dispersa da HSP70 e não foi observada a marcação intensa em torno da cromatina. Em apenas 1 dos 6 oócitos avaliados houve marcação no corpúsculo polar. Não foi observada marcação nos oócitos utilizados como controle negativo.

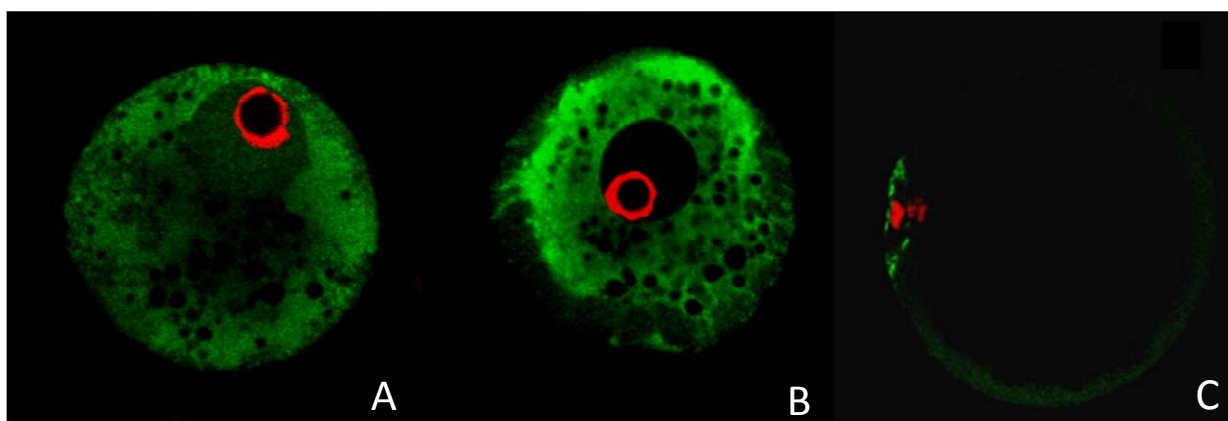


Figura 14 - Distribuição da HSP70 (FITC - verde) e marcação da cromatina (iodeto de propídeo - vermelho). Nos oócitos imaturos (0 hora) em A, observa-se a presença da HSP70 no interior do núcleo, o que não foi observado em B. Observou-se a migração da HSP70 para o corpúsculo polar em parte dos oócitos maturados (C)

5.1.3 Avaliação da Maturação nuclear

A tabela 3 mostra que não houve interação entre o efeito da atmosfera utilizada e a suplementação do meio de maturação oocitária nos índices de vesícula germinativa/quebra da vesícula germinativa, Metáfase 1 e Metáfase 2. Pode-se observar que houve diferença entre as réplicas realizadas.

Tabela 3 - Efeito (p) da réplica, atmosfera, suplementação do meio de maturação e interação entre a atmosfera e a suplementação do meio de maturação nos índices de vesícula germinativa/quebra da vesícula germinativa, Metáfase 1 e Metáfase 2, São Paulo, 2009

	Réplica	Atmosfera	Suplementação	ATxSuple*
p (VG/QVG)	<0.00001	0,310	0,609	0,132
p (M1)	<0.00001	0,835	0,840	0,719
p (M2)	<0.00001	0,431	0,921	0,216

*ATxSuple – interação da atmosfera e a suplementação do meio de maturação

Como descrito abaixo, nas figuras 15, 16 e 17, não houve efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação nos índices de oócitos em vesícula germinativa/quebra da vesícula germinativa, metáfase 1 e metáfase 2.

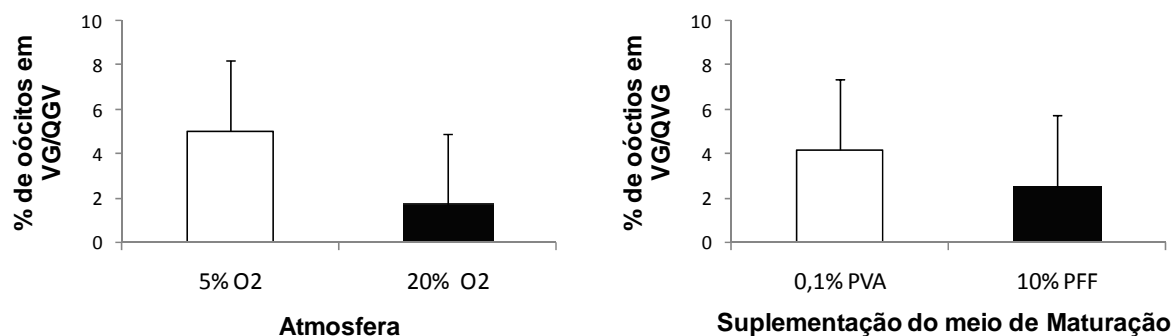


Figura 15 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação na média das porcentagens de Vesícula germinativa e quebra da vesícula germinativa de oócitos maturados *in vitro*. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP

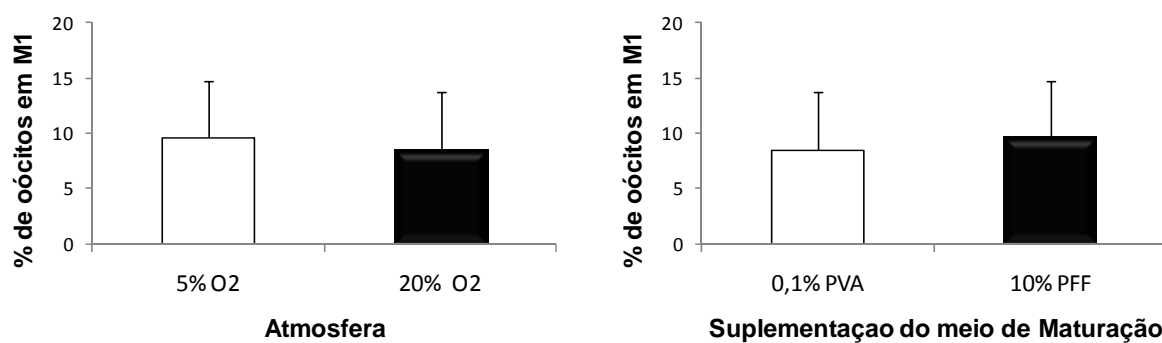


Figura 16 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação na média das porcentagens de Metáfase 1 de oócitos maturados *in vitro*. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP

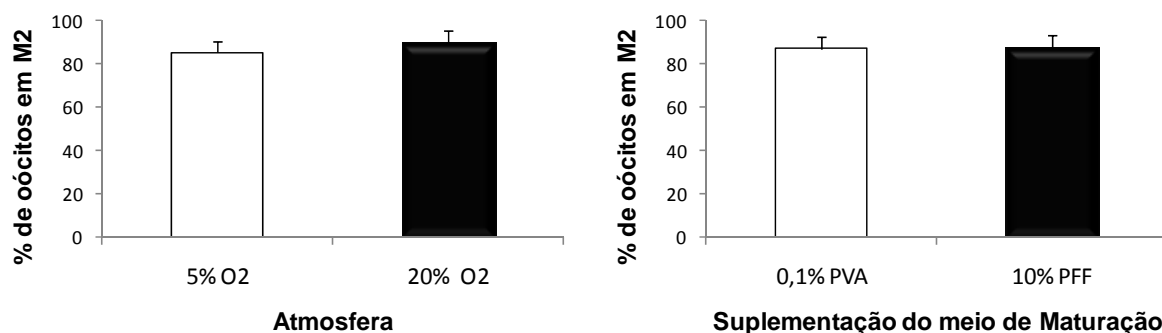


Figura 17 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação na média das porcentagens de Metáfase 2 de oócitos maturados *in vitro*. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP

5.1.4 Avaliação da concentração oocitária de glutatona reduzida

A tabela 4 mostra que não houve interação entre o efeito da atmosfera utilizada e a suplementação do meio de maturação oocitária na média das concentrações intracelulares de glutatona dos oócitos. Pode-se observar que houve diferença entre as réplicas realizadas.

Tabela 4 - Efeito (p) da réplica, atmosfera, suplementação do meio de maturação e interação entre a atmosfera e a suplementação do meio de maturação na média das concentrações intracelulares de glutatona dos oócitos, São Paulo, 2009

	Réplica	Atmosfera	Suplementação	ATxSuple*
p	<0.00001	0,327	0,775	0,216

*ATxSuple – interação da atmosfera e a suplementação do meio de maturação

As concentrações intracelulares de glutatona dos oócitos são apresentadas na figura 18. Não houve efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação na média das concentrações de glutatona dos oócitos maturados *in vitro*.

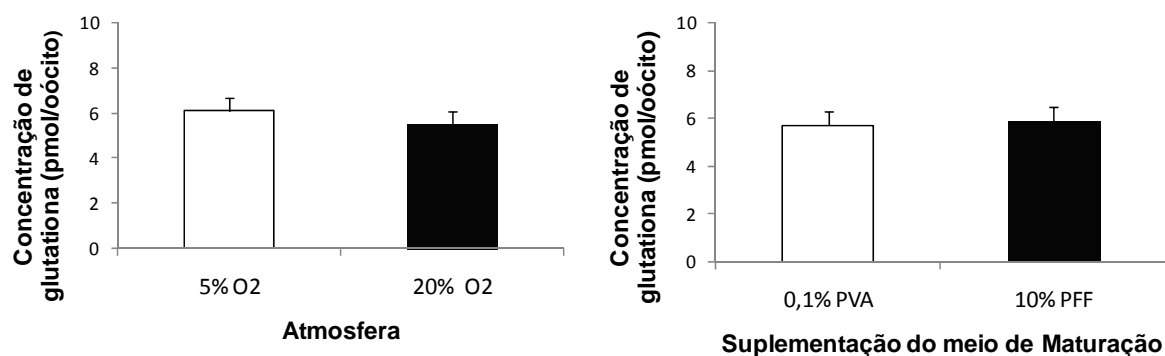


Figura 18 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação na média das concentrações intracelular de GSH (pmol/oócito) de oócitos maturados *in vitro*. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP

Na figura 19 pode-se observar que não houve diferença entre as concentrações de glutatona de cada um dos grupos de maturados *in vitro*, o grupo maturado *in vivo* e o grupo 0 hora.

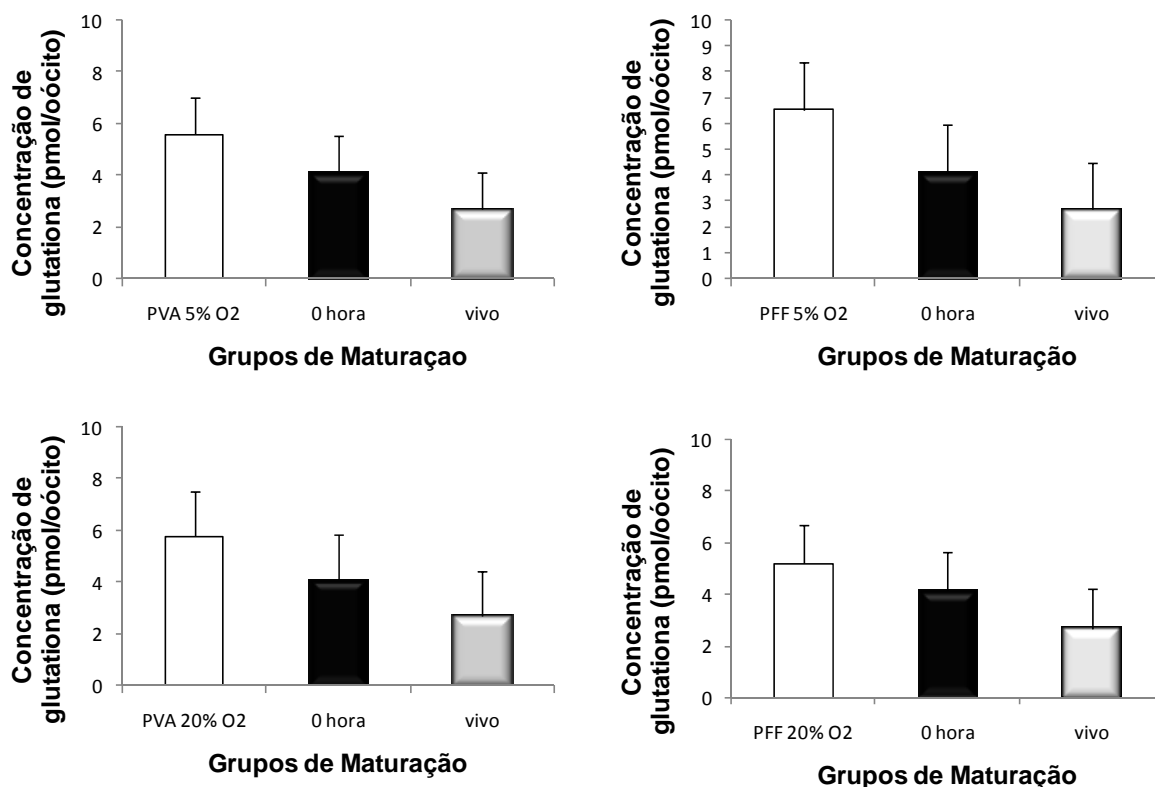


Figura 19 - Média das concentrações de glutatona de oócitos antes (0 hora) e depois da maturação *in vitro* nos diferentes tratamentos e da maturação *in vivo*. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP

5.1.5 Avaliação dos índices de penetração espermática

A tabela 5 mostra que não houve interação entre o efeito da atmosfera utilizada e da suplementação do meio de maturação oocitária nos índices de zigotos monospérmicos, polispérmicos e de oócitos não fecundados. Pode-se observar que houve diferença entre as réplicas realizadas.

Tabela 5 - Efeito (p) da réplica, atmosfera, suplementação do meio de maturação e interação entre a atmosfera e a suplementação do meio de maturação nos índices monospermia, polispermia e óocitos não fecundados, São Paulo, 2009

	Réplica	Atmosfera	Suplementação	ATxSuple*
p (Monospermia)	<0.00001	0,569	0,356	0,877
p (Polispermia)	<0.00001	0,714	0,475	0,817
p (não fecundados)	<0.00001	0,298	0,935	0,786

*ATxSuple – interação da atmosfera e a suplementação do meio de maturação

Ao compararem-se os índices de dos zigotos monospérmicos, polispérmico e de óocitos não fecundados após a fecundação *in vitro* (figuras 20, 21 e 22) observou-se que não houve efeito da atmosfera utilizada durante o período de maturação e da suplementação do meio de maturação oocitária.

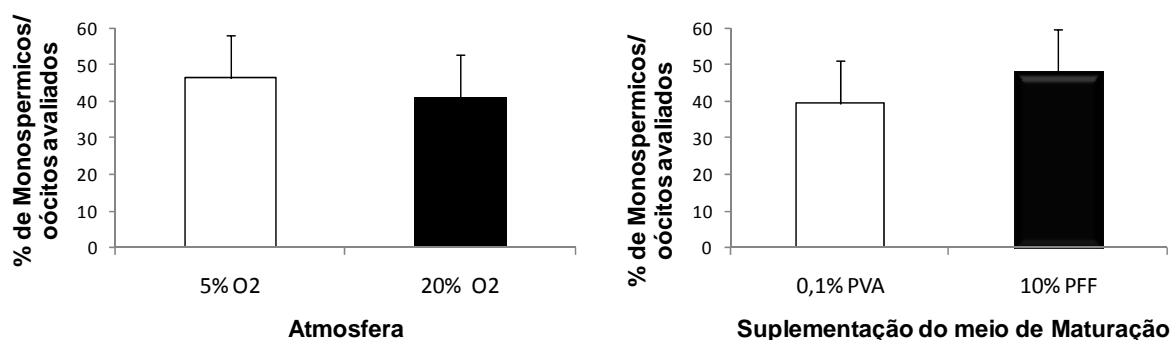


Figura 20 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação na média das porcentagens de zigotos monospérmicos após a fecundação *in vitro* de óocitos maturados *in vitro* nos diferentes tratamentos. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP

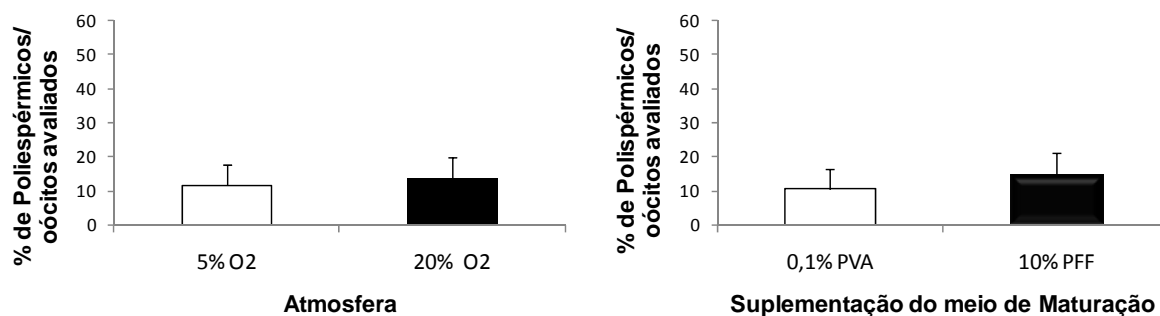


Figura 21 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação na média das porcentagens de zigotos poliespérmicos após a fecundação *in vitro* de oócitos maturados *in vitro* nos diferentes tratamentos. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP

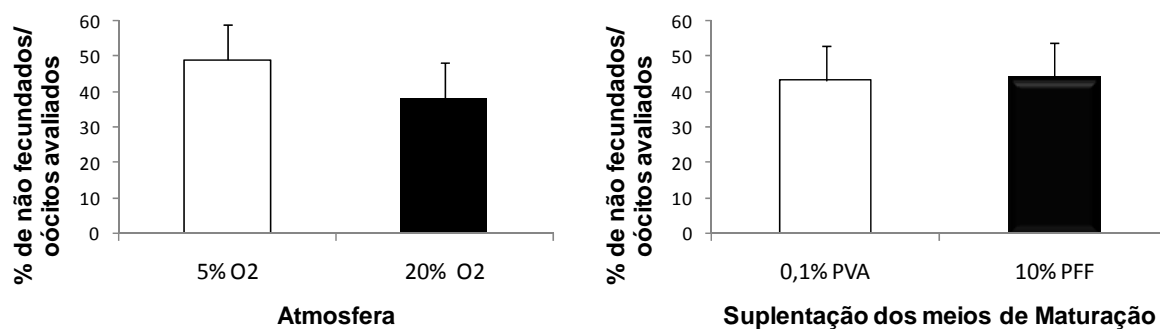


Figura 22 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação na média das porcentagens de oócitos não fecundados após a fecundação *in vitro* de oócitos maturados *in vitro* nos diferentes tratamentos. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP

5.1.6 Cultivo *in vitro* e avaliação do número e viabilidade de blastômeros

A tabela 6 mostra que não houve interação entre o efeito da atmosfera utilizada e a suplementação do meio de maturação oocitária nos índices de zigotos clivados (com mais de uma célula). Contudo, observou-se interação entre o efeito das atmosferas utilizadas e a suplementação do meio de maturação nos índices de

blastocistos sobre zigotos clivados e blastocistos sobre total de oócitos fecundados *in vitro*. Pode-se observar que houve diferença entre as réplicas realizadas.

Tabela 6 - Efeito (p) da réplica, atmosfera, suplementação do meio de maturação e interação entre a atmosfera e a suplementação do meio de maturação nos índices de clivagem, blastocistos/clivados e blastócitos/fecundados, São Paulo, 2009

	Réplica	Atmosfera	Suplementação	ATxSuple*
p (Clivagem)	<0.00001	0,0414	0,181	0,781
p (Blastocistos/clivados)	<0.00001	0,443	0,416	0,033
p (Blastocistos/fecundados)	<0.00001	0,255	0,227	0,049

*ATxSuple – interação da atmosfera e a suplementação do meio de maturação

Na figura 22 observa-se que foi verificado efeito da atmosfera na média das porcentagens de zigotos clivados, tendo os oócitos maturados em atmosfera contendo 20% de O₂ apresentado maiores índices de clivagem após a fecundação *in vitro* (p = 0,041). Porém, não houve efeito da suplementação do meio de maturação oocitária.

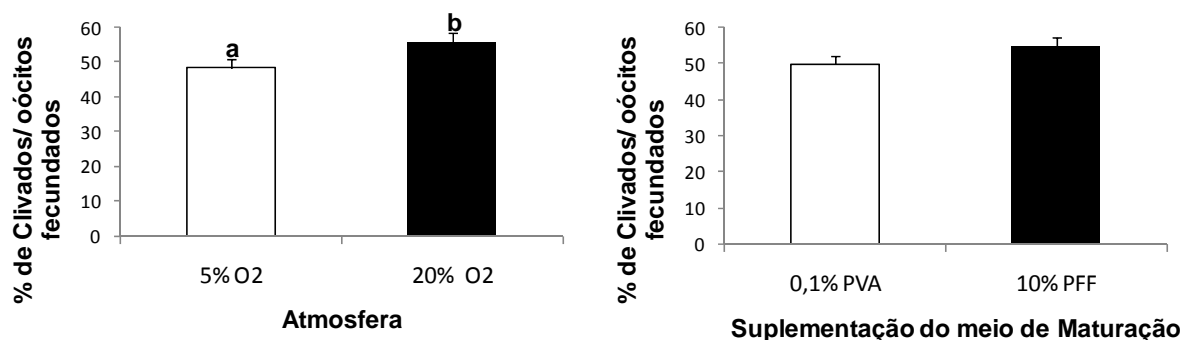


Figura 23 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação na média das porcentagens de zigotos clivados (dia 3 de desenvolvimento) após a fecundação de oócitos maturados *in vitro* nos diferentes tratamentos. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($P < 0,05$). Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP

Não foi observada diferença entre os grupos de maturação nos índices de blastocistos sobre o número embriões clivados (figura 24) e nos índices de blastocistos sobre o número total de oócitos fecundados *in vitro* (figura 25).

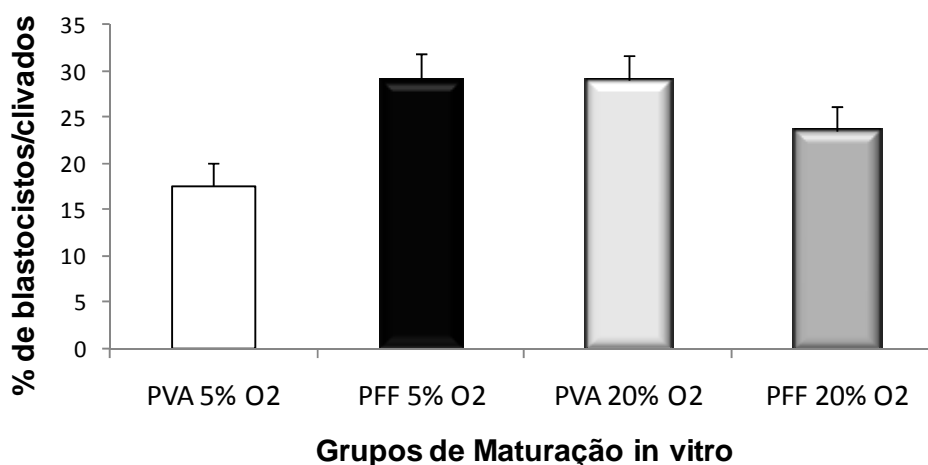


Figura 24 - Média das porcentagens de blastocistos sobre o número de zigotos clivados (dia 7 de desenvolvimento) após a fecundação de oócitos maturados *in vitro* nos diferentes tratamentos. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP

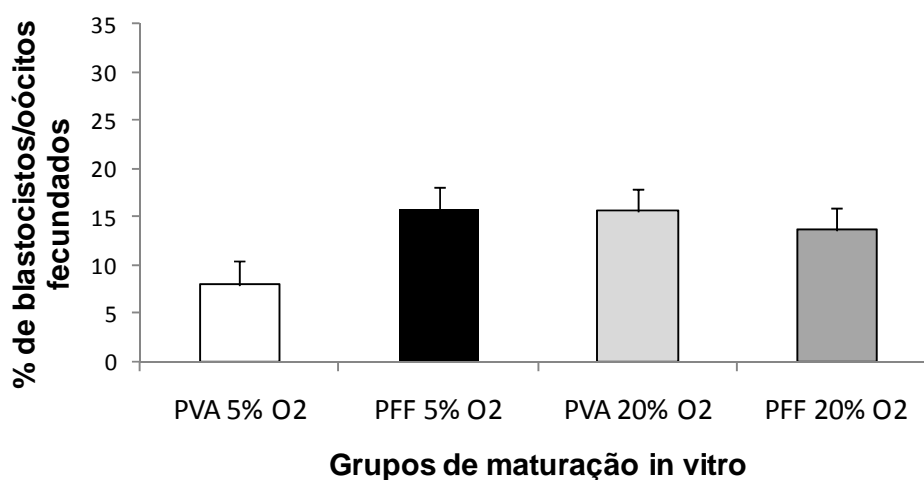


Figura 25 - Média das porcentagens de blastocistos sobre o número de oócitos (dia 7 de desenvolvimento) após a fecundação de oócitos maturados *in vitro* nos diferentes tratamentos. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP

A tabela 7 mostra que não houve interação entre o efeito da atmosfera utilizada e a suplementação do meio de maturação oocitária no número total de blastômeros, número de blastômeros em necrose e número de blastômeros em apoptose. Pode-se observar que houve diferença entre as réplicas realizadas.

Tabela 7 - Efeito (p) da réplica, atmosfera, suplementação do meio de maturação e interação entre a atmosfera e a suplementação do meio de maturação nas médias de número total de blastômeros, número de blastômeros em necrose e número de blastômeros em apoptose, São Paulo, 2009

	Réplica	Atmosfera	Suplementação	ATxSuple*
p (total de blastômeros)	<0.00001	0,0007	0,295	0,321
p (blastômeros em necrose)	<0.00001	0,622	0,264	0,924
p (blastômeros em apoptose)	<0.00001	0,783	0,783	0,533

*ATxSuple – interação da atmosfera e a suplementação do meio de maturação

A figura 26 ilustra que houve efeito da atmosfera utilizada no período da maturação oocitária no número médio de células dos embriões produzidos por fecundação *in vitro*, tendo os grupos maturados em atmosfera com 20% de O₂ apresentado melhores resultados ($p = 0,0007$). Não houve efeito da suplementação do meio de maturação no número médio de células dos embriões.

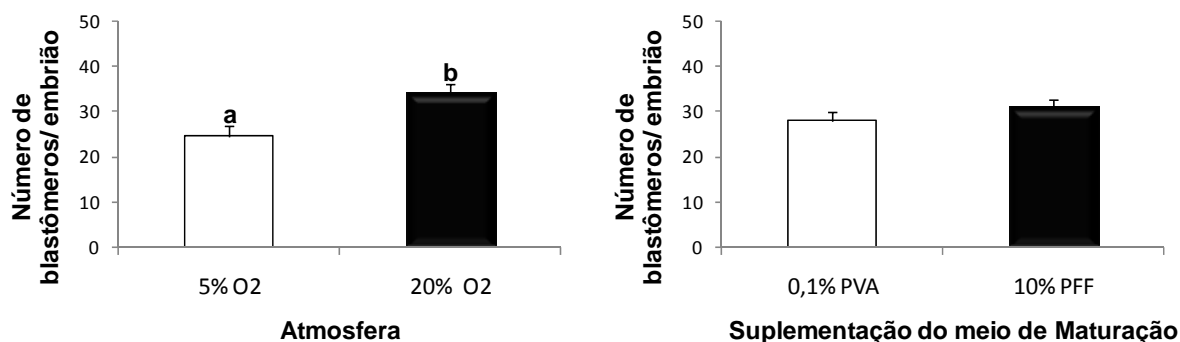


Figura 26 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação no número médio de células dos blastocistos produzidos por fecundação de oócitos maturados *in vitro* nos diferentes tratamentos. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($P < 0,05$). Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP

Não houve efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação oocitária no número médio de células em necrose dos embriões produzidos por fecundação *in vitro* (Figura 27).

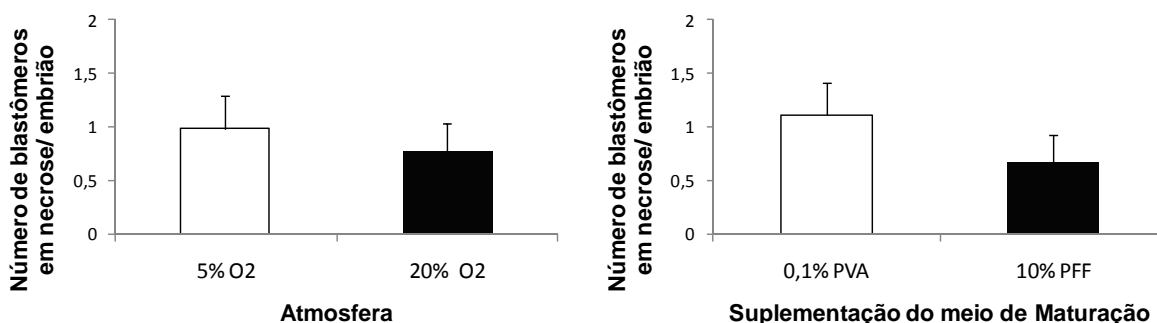


Figura 27 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação no número médio de células em necrose dos blastocistos produzidos por fecundação de oócitos maturados *in vitro* nos diferentes tratamentos. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP

Não houve efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação oocitária no número médio de células em apoptose dos embriões produzidos por fecundação *in vitro* (Figura 28).

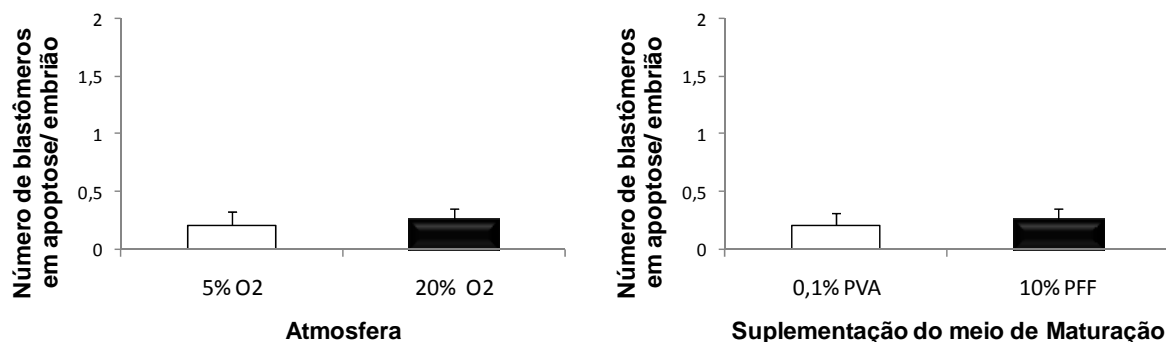


Figura 28 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação no número médio de células em apoptose dos blastocistos produzidos por fecundação *in vitro* de oócitos maturados *in vitro* nos diferentes tratamentos. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP

5.2 AVALIAÇÕES DO SISTEMA DE MATURAÇÃO OOCITÁRIA

5.2.1 Análise do ciclo celular das células do cumulus por citometria de fluxo

A tabela 8 mostra que não houve interação entre o efeito da atmosfera utilizada e a suplementação do meio de maturação oocitária nas médias das porcentagens de células do cumulus em cada fase do ciclo celular. Pode-se observar que houve diferença entre as réplicas realizadas.

Tabela 8 - Efeito (p) da réplica, atmosfera, suplementação do meio de maturação e interação entre a atmosfera e a suplementação do meio de maturação nas médias das porcentagens de células do cumulus em cada fase do ciclo celular, São Paulo, 2009

	Réplica	Atmosfera	Suplementação	ATxSuple*
p (G0/G1)	<0.00001	0,803	0,130	0,921
p (S)	<0.00001	0,266	0,791	0,348
p (G2/M)	<0.00001	0,488	0,049	0,233

*ATxSuple – interação da atmosfera e a suplementação do meio de maturação

Não houve efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação oocitária nas porcentagens de células do cumulus nas fases G0/G1 e S. Não houve efeito da atmosfera, mas houve efeito da suplementação do meio de maturação oocitária nas porcentagens de células do cumulus na fase G2/M, apresentando as células provenientes de oócitos maturados em meio suplementado com 0,1% de PVA maiores índices ($p = 0,049$; figuras 29, 30 e 31).

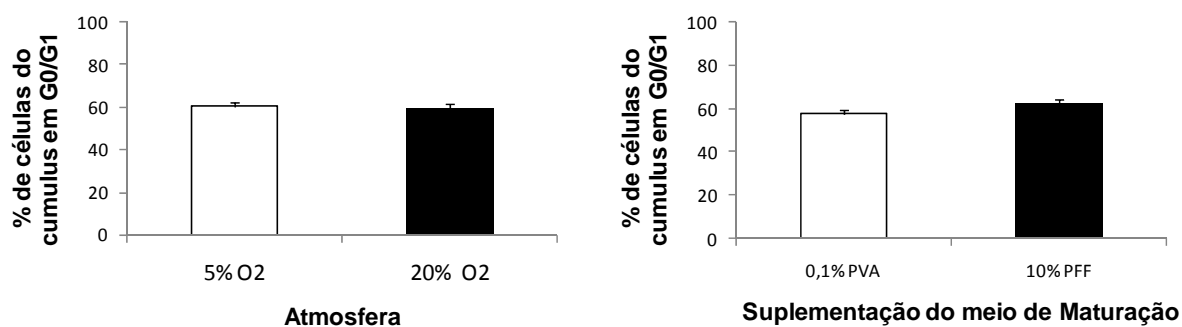


Figura 29 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação nas médias das porcentagens de células do cumulus na fase G0/G1 do ciclo celular. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP

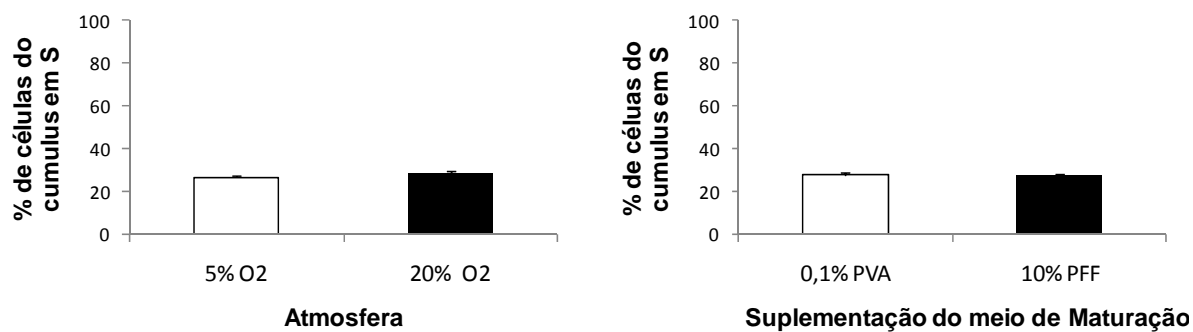


Figura 30 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação nas médias das porcentagens de células do cumulus na fase S do ciclo celular. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP.

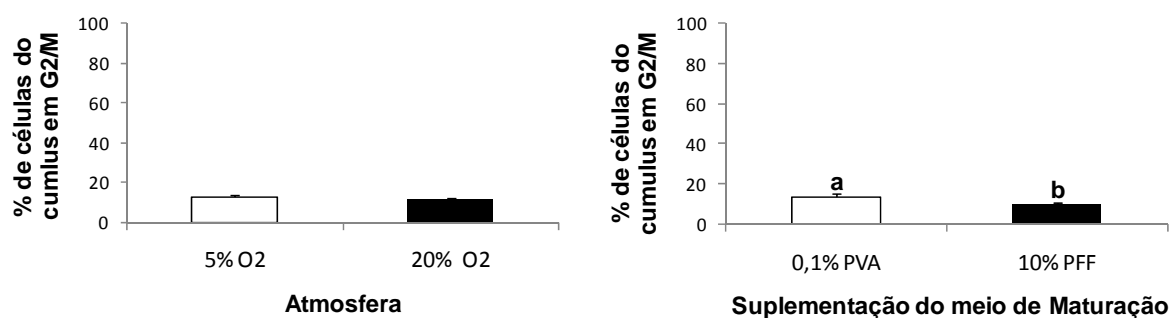


Figura 31 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação nas médias das porcentagens de células do cumulus na fase G2/M do ciclo celular. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($P < 0,05$). Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP.

Nas comparações entre os grupos de maturação, pode-se observar que para todas as fases do ciclo celular foi verificada diferença entre o grupo 0 hora e os grupos maturados com 0,1% de PVA, independente da atmosfera utilizada. Observa-se que o grupo 0 hora apresentou maior porcentagem de células em G0/G1 quando comparado com PVA 5% de O₂ ($p = 0,04$) e PVA 20% de O₂ ($p = 0,042$). O grupo 0 hora ainda apresentou menor porcentagem de células na fase S que PVA 5% de O₂ ($p = 0,04$) e PVA 20% de O₂ ($p = 0,05$) e menor porcentagem de células nas fases G2/M que PVA 5% de O₂ ($p = 0,035$) e PVA 20% de O₂ ($p = 0,023$). Não foi verificada diferença entre o grupo 0 hora e ambos os grupos maturados com 10% de PFF (Figura 32).

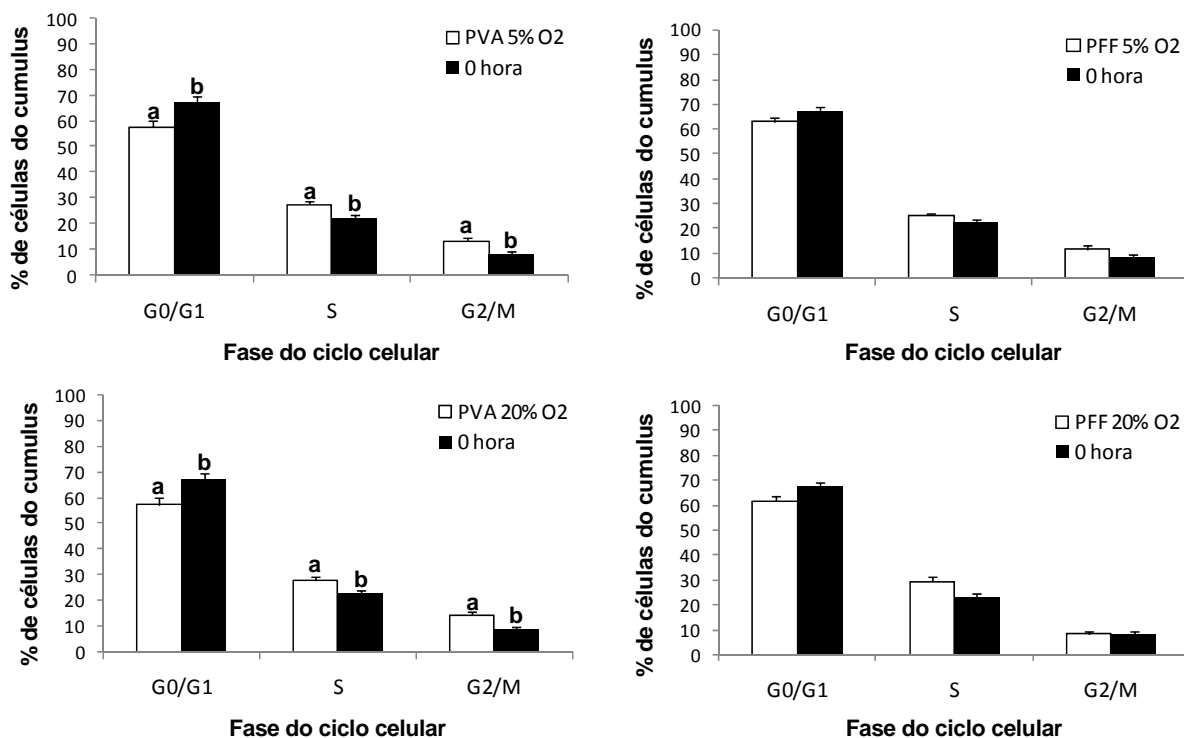


Figura 32 - Média das porcentagens de células do cumulus em cada fase do ciclo celular provenientes de oócito antes (0 hora) e depois da maturação *in vitro* nos diferentes tratamentos. Letras diferentes sobrescritas em cada barra, dentro de cada fase do ciclo celular, representam diferença significativa ($P < 0,05$). Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP

5.2.2 Número de células do cumulus por oócito

A tabela 9 mostra que não houve interação entre o efeito da atmosfera utilizada e a suplementação do meio de maturação oocitária no número de células do cumulus por oócitos. Pode-se observar que houve diferença entre as réplicas realizadas.

Tabela 9 - Efeito (p) da réplica, atmosfera, suplementação do meio de maturação e interação entre a atmosfera e a suplementação do meio de maturação nas médias de número de médio de células do cumulus por oócito, São Paulo, 2009

	Réplica	Atmosfera	Suplementação	ATxSuple*
p	<0.00001	0,0045	0,529	0,403

*ATxSuple – interação da atmosfera e a suplementação do meio de maturação

Os oócitos maturados em atmosfera com 5% de O₂ apresentaram maior número médio de células do cumulus por oócito que os maturados em 20% de O₂ (p = 0,0045). Não houve efeito da suplementação do meio de maturação oocitária no número médio de células do cumulus por oócito (Figura 33).

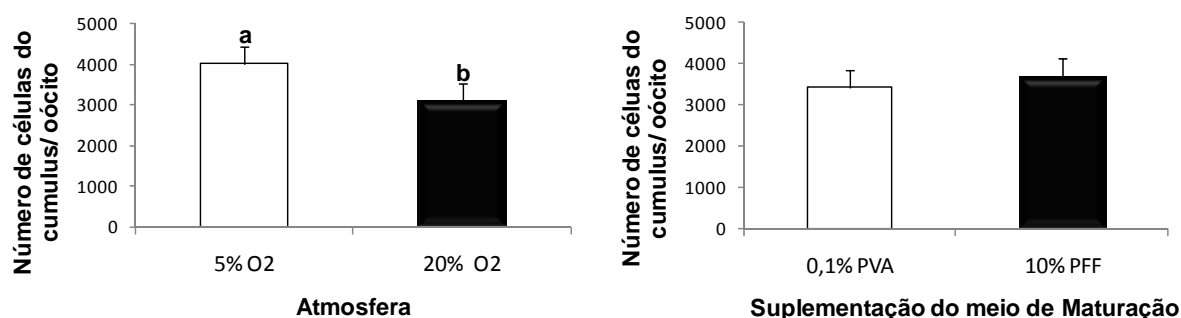


Figura 33 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação no número médio de células do cumulus por oócito maturados *in vitro* nos diferentes tratamentos. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa (P<0,05). Os dados representam as médias dos quadrados mínimos ± EP

A figura 34 ilustra que não houve diferença no número médio de células do cumulus por oócito entre o grupo 0 hora e os grupos maturados *in vitro*, com exceção do grupo maturado em 5% de O₂ e suplementado com 10% de PFF que apresentou número médio maior de células que o grupo 0 hora (p = 0,0035).

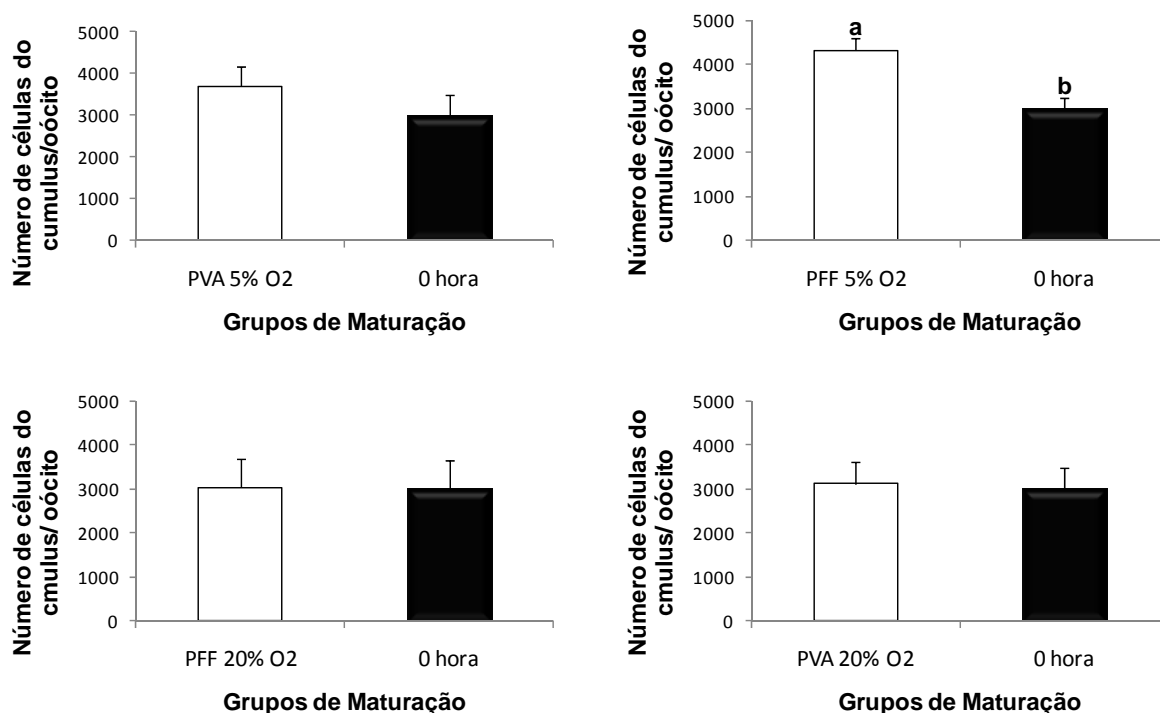


Figura 34 - Média do número de células por oócito antes (0 hora) e depois da maturação *in vitro* nos diferentes tratamentos. Letras diferentes sobrescritas em cada barra representam diferença significativa ($P < 0,05$). Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP

5.2.3 Avaliação das concentrações de glutathiona reduzida (GSH) nas células do cumulus.

A tabela 10 mostra que não houve interação entre o efeito das atmosferas utilizadas e a suplementação do meio de maturação oocitária na média das concentrações intracelulares de glutathiona das células do cumulus. Pode-se observar que houve diferença entre as réplicas realizadas.

Tabela 10 - Efeito (p) da réplica, atmosfera, suplementação do meio de maturação e interação entre a atmosfera e a suplementação do meio de maturação nas médias das concentrações intracelulares de glutathione das células do cumulus, São Paulo, 2009

	Réplica	Atmosfera	Suplementação	ATxSuple*
p	<0.00001	0,029	0,892	0,894

*ATxSuple – interação da atmosfera e a suplementação do meio de maturação

As concentrações intracelulares de glutathione das células do cumulus são apresentadas na figura 35. Foi verificado que as células do cumulus pertencentes a oócitos que foram maturados em atmosfera contendo 20% de O₂ apresentaram maiores concentrações de glutathione (p = 0,029). Não houve efeito da suplementação do meio de maturação na média das concentrações de glutathione das células do cumulus.

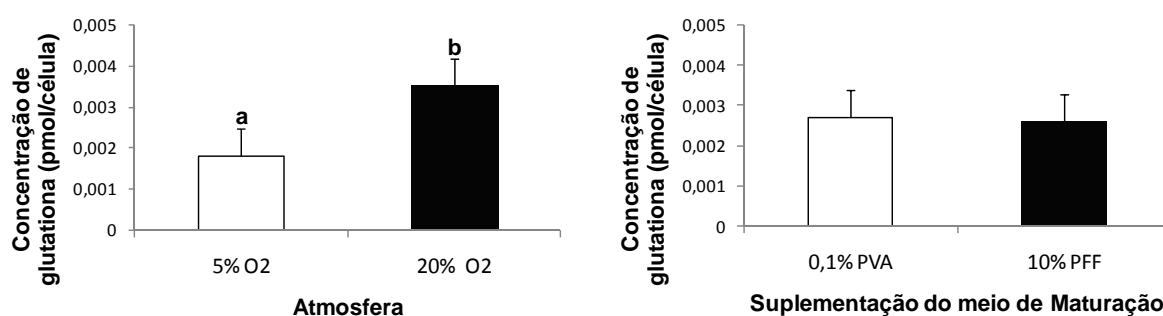


Figura 35 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação na média das concentrações intracelular de GSH (pmol/célula) de células provenientes de oócitos maturados *in vitro*. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP

Na figura 36 pode-se observar que não houve diferença nas médias das concentrações de glutathione das células do cumulus pertencentes ao grupo 0 hora quando comparado com cada um dos grupos da maturação *in vitro*.

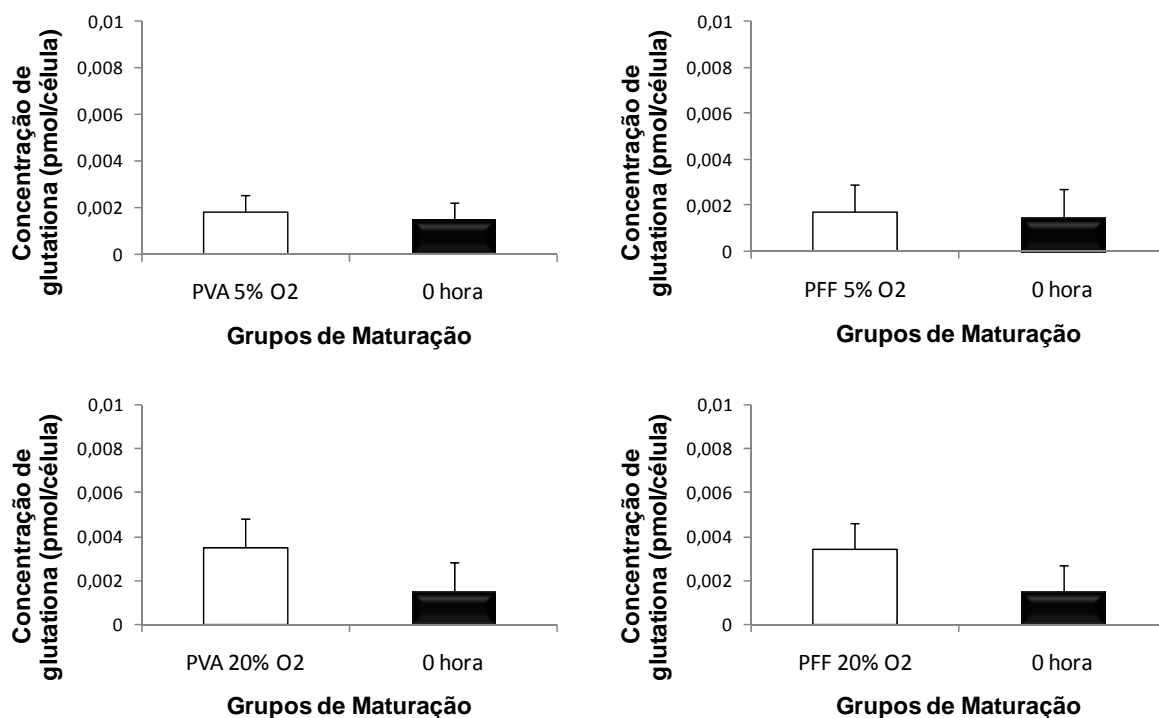


Figura 36 - Média das concentrações de glutathione por célula do cumulus pertencentes a oócitos antes (0 hora) e depois da maturação *in vitro* nos diferentes tratamentos. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP

5.2.4 Avaliação dos TBARS nos meios de maturação

A tabela 11 mostra que não houve interação entre o efeito da atmosfera utilizada e a suplementação do meio de maturação oocitária nas médias das concentrações de TBARS nos meios após nas 22 horas iniciais e nas 22 horas finais de maturação. Pode-se observar que houve diferença entre as réplicas realizadas.

Tabela 11 - Efeito (p) da réplica, atmosfera, suplementação do meio de maturação e interação entre a atmosfera e a suplementação do meio de maturação nas médias das concentrações de TBARS nos meios após as 22 horas iniciais ou 22 horas finais de maturação, São Paulo, 2009

	Réplica	Atmosfera	Suplementação	ATxSuple*
p (22 horas iniciais)	<0.00001	0,671	0,189	0,507
P (22 horas finais)	<0.00001	0,872	0,935	0,058

*ATxSuple – interação da atmosfera e a suplementação do meio de maturação

Não houve efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação oocitária nas médias das concentrações de TBARS nos meios de maturação após as primeiras 22 horas e após as 22 horas finais de maturação (Figuras 37 e 38).

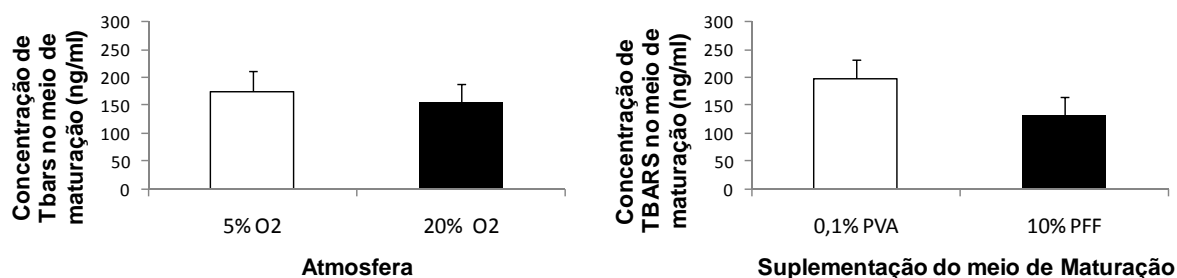


Figura 37 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação nas médias das concentrações de TBARS nos meios após as 22 horas iniciais da maturação oocitária. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP

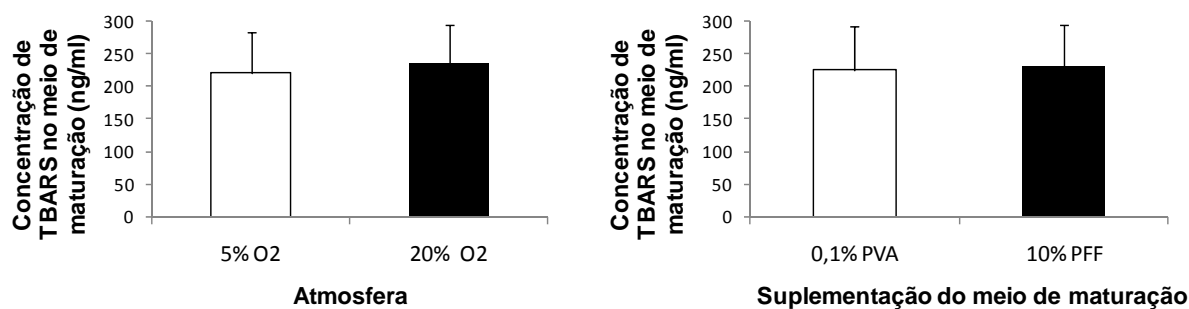


Figura 38 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação nas médias das concentrações de TBARS nos meios após as 22 horas finais da maturação oocitária. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP

5.2.5 Avaliação da resistência das células do cumulus ao estresse oxidativo

A tabela 12 mostra que não houve interação entre o efeito da atmosfera utilizada e a suplementação do meio de maturação oocitária nas médias das concentrações de TBARS nas células do cumulus após o teste de resistência das células ao estresse oxidativo. Pode-se observar que houve diferença entre as réplicas realizadas.

Tabela 12 - Efeito (p) da réplica, atmosfera, suplementação do meio de maturação e interação entre a atmosfera e a suplementação do meio de maturação nas médias das concentrações de TBARS por célula do cumulus, São Paulo, 2009

	Réplica	Atmosfera	Suplementação	ATxSuple*
p	<0.00001	0,642	0,135	0,072

*ATxSuple – interação da atmosfera e a suplementação do meio de maturação

Não houve efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação oocitária no nas médias das concentrações de TBARS por células do cumulus após o teste de resistência das células ao estresse oxidativo (Figuras 39).

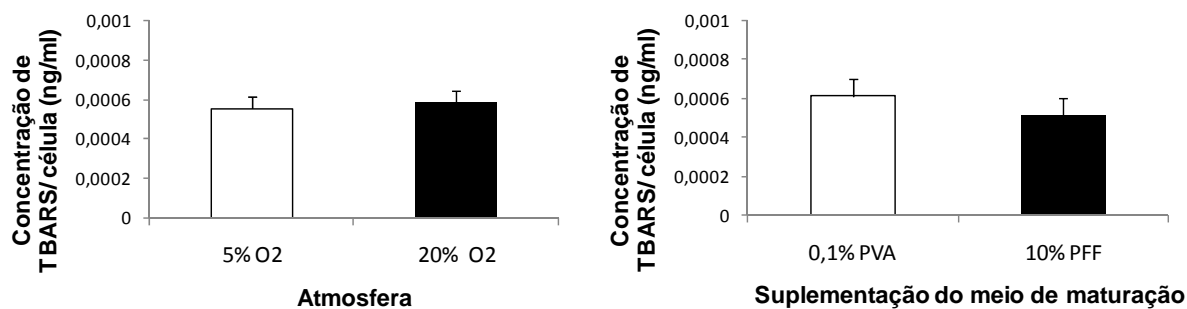


Figura 39 - Efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação nas médias das concentrações de TBARS nas células do cumulus após o teste de resistência ao estresse oxidativo. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP

Na figura 40 pode-se observar que não houve diferença nas médias das concentrações de TBARS das células do cumulus pertencentes a oócitos antes (0 hora) e depois da maturação *in vitro* nos diferentes tratamentos após o teste de resistência ao estresse oxidativo.

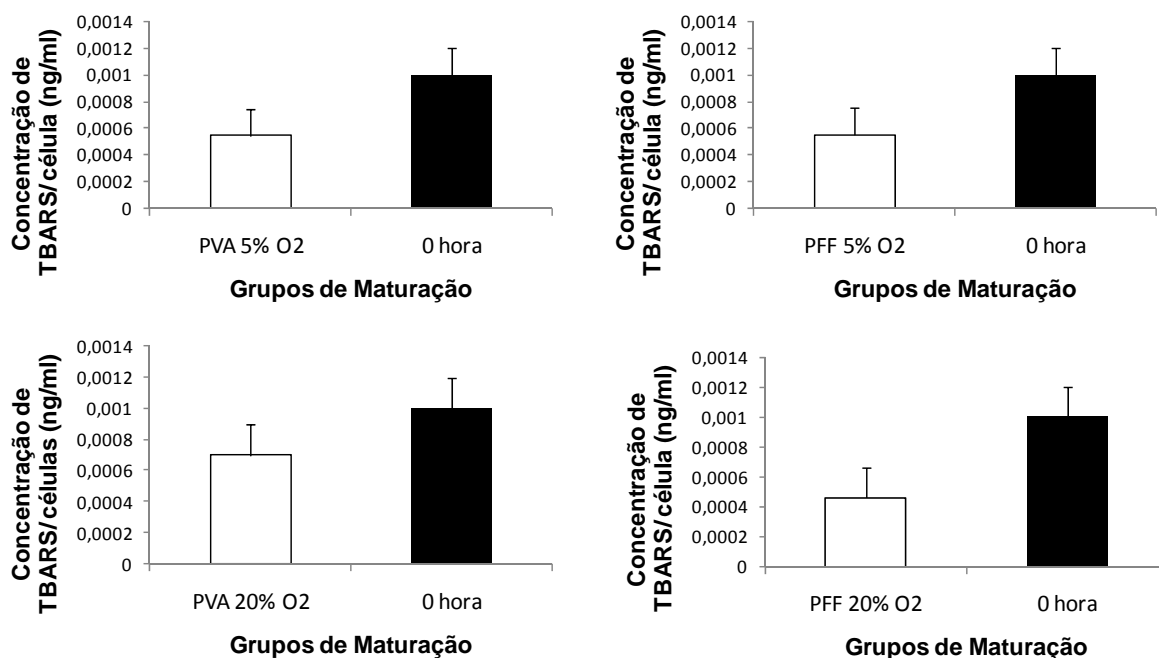
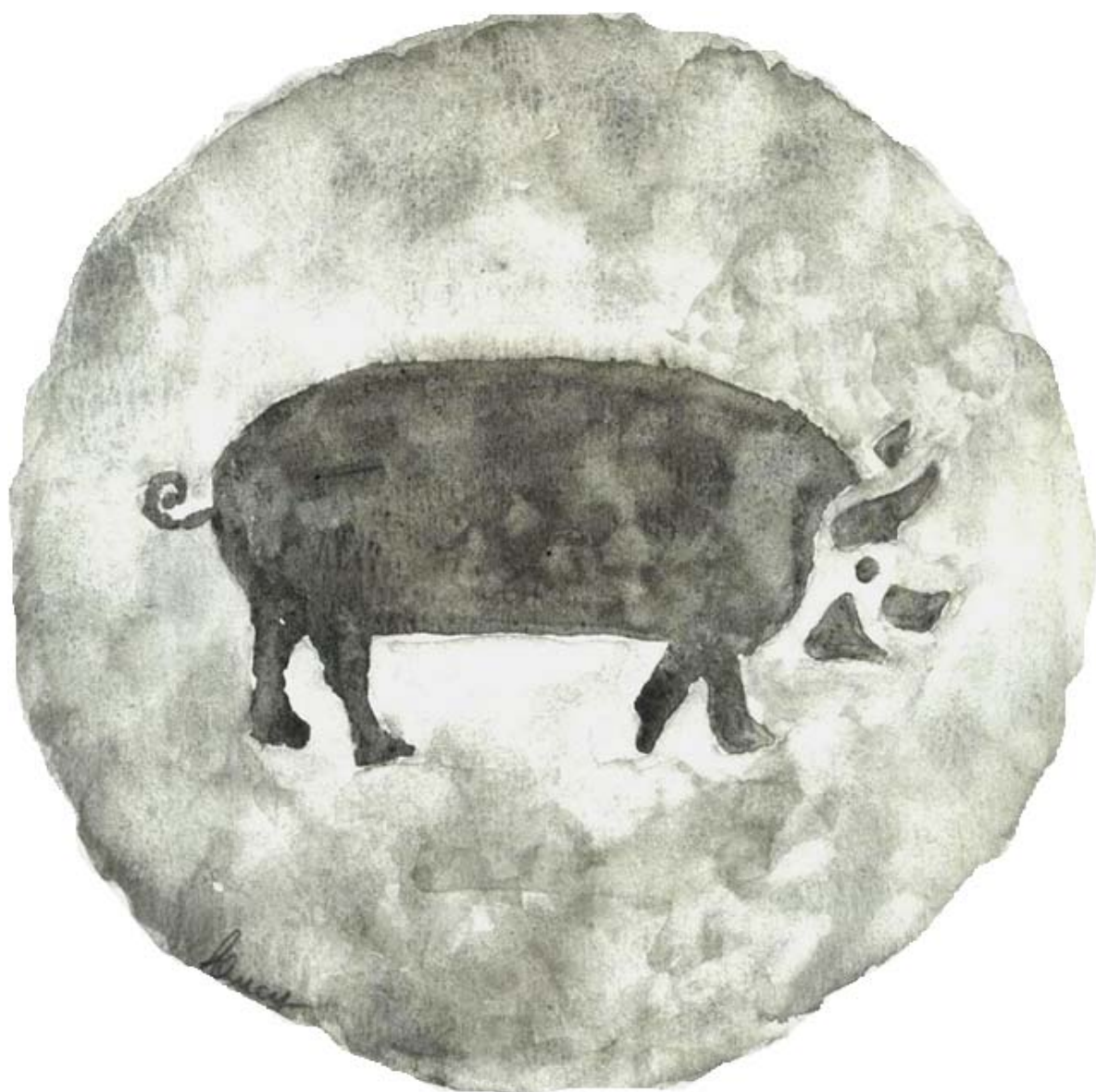


Figura 40 - Média das concentrações de TBARS por célula do cumulus pertencentes a oócitos antes (0 hora) e depois da maturação *in vitro* nos diferentes tratamentos após o teste de resistência ao estresse oxidativo. Os dados representam as médias dos quadrados mínimos \pm EP



6 DISCUSSÃO

Muitos estudos têm verificado o efeito do estresse térmico sobre a maturação oocitária em diferentes espécies, como em camundongos (LIU et al., 2004), em bovinos (EDWARDS; HANSEN, 1996) e em suínos (LÁNSKÁ et al., 2006) demonstrando resultados evidentes dos danos causados por este tipo de estresse.

Quanto ao estresse oxidativo na maturação oocitária, os estudos já foram realizados em suínos (BING et al., 2002; OZAWA et al., 2006; MAEDOMARI et al., 2007). Porém mais estudos são necessários para compreensão do efeito deste tipo estresse sobre a maturação.

Uma série de fatores contribui para a grande variação dos resultados encontrados em estudos realizados com maturação oocitária em suínos quando comparada com outras espécies animais. Isso inclui as variações entre laboratórios, idade das doadoras, a qualidade dos oócitos e as metodologias empregadas para maturação de oócitos (sistemas de cultivo e meios de maturação). Desta forma, a comparação com a literatura apresentada para a espécie é bastante difícil.

Assim, se faz necessário o estabelecimento dos padrões da espécie para oócitos maturados *in vivo*, tendo desta forma, um modelo a ser alcançado *in vitro*.

Este estudo está em concordância com os resultados descritos por Kikuchi et al. (2002) e Iwamoto et al. (2004) que não encontraram efeito da atmosfera controlada sobre a maturação nuclear. Porém, em ambos, os oócitos maturados em 5% de O₂ produziram após a FIV e ativação partenogenética, respectivamente, embriões com maior número de células do que os oócitos maturados em atmosfera convencional.

Porém, sabe-se que na espécie suína, vários laboratórios de pesquisa têm alcançando índices satisfatórios de maturação nuclear, mas ainda falham em proporcionar ao oócito uma maturação citoplasmática adequada.

A migração dos grânulos corticais é utilizada em suínos como marcador de maturação citoplasmática, pois um dos principais problemas encontrados na espécie é a polispermia.

Neste estudo, foi verificado que a suplementação do meio de maturação com PFF apresentou maiores índices de migração dos grânulos corticais. Este resultado

poderia indicar que estes oócitos tendem a ter melhor resposta à fecundação *in vitro*, pois seriam mais capacitados a bloquear a polispermia. Contudo, isso não foi verificado, pois não houve efeito de suplementação do meio de maturação nem da atmosfera nos índices de polispermia.

O sistema de fecundação *in vitro* utilizado neste estudo apresentou baixos índices de polispermia, 12,6% em média. Os índices de polispermia apresentados na literatura são bastante variados. Matás et al. (2003) mostrou que quando os espermatozóides foram separados pelo gradiente de percoll, índices de polispermia de 93% foram encontrados.

Suzuki et al. (2003) evidenciaram que os índices de polispermia variam de acordo com a raça do macho utilizado, também apresentando altos índices de polispermia: 21,5% para animais Duroc, 20,2% para animais Landrace e 54,1% para animais Large White.

No entanto, nestes estudos o período de incubação oócito/espermatozóides foi de 6 horas. No protocolo estabelecido no presente estudo os oócitos foram separados dos espermatozóides não aderidos a zona pelúcida após 30 minutos de incubação. Desta forma, foram obtidos índices baixos de polispermia. Por outro lado, os índices de não fecundados foram altos, 43,6% em média.

Diante do fato que embriões polispérmicos se desenvolvem até o estágio de blastocisto e pelo descrito por Sonfai et al. (2008) que afirmaram que embriões polispérmicos apresentam uma alta frequência de fragmentação durante o desenvolvimento embrionário precoce, neste estudo optou-se por um protocolo que proporcionou baixos índices de polispermia, mesmo com a desvantagem de se ter um maior número de não fecundados. Desta forma, os embriões produzidos seriam de melhor qualidade.

A glutathione está presente em todos os tipos celulares, geralmente em grandes concentrações, entre 1 e 10mM, sendo o mais abundante peptídeo de baixo peso molecular (MEISTEI, 1988). Vários estudos avaliam as concentrações de glutathione em oócitos. Como ocorre rotineiramente na espécie suína, estes valores são bem variados. Neste experimento foi observado, para oócitos antes do período de maturação a concentração média de glutathione de 4,13pmol/oócito e após a maturação *in vitro* $6,08 \pm 0,61$ e $5,46 \pm 0,61$ pmol/oócito, respectivamente, em atmosferas com 5 e 20% de O₂,

Ozawa et al. (2006), utilizando atmosfera com 5% de O₂, obtiveram 2,5pmol/oócito após 44 horas de maturação. Maedomari et al. (2007), obtiveram 4,03 ± 0,63pmol/oócito a 0 hora e após 44 horas de maturação utilizando atmosfera com 5% de O₂, 9,60 ± 0,40pmol/oócito, demonstrando aumento durante a maturação oocitária nas concentrações e alcançando altas concentrações após a maturação.

Bing et al. (2002) obtiveram valores de 6,97 ± 1,3pmol/oócito para oócitos 0 hora e 2,67 ± 0,5 e 2,57 ± 0,5pmol/oócito para oócitos maturados, respectivamente, em atmosferas com 5 e 20% de O₂, demonstrando diminuição das concentrações durante a maturação. Assim como descrito neste estudo, não houve efeito da atmosfera nas concentrações de glutathiona dos oócitos.

No entanto, em nosso estudo foi verificado efeito da atmosfera nas concentrações de glutathiona nas células do cumulus, nas quais foi encontrado maior concentração naquelas expostas à atmosfera de 20% de O₂ (0,0035 ± 0,00068pmol/célula) que as expostas a 5% de O₂ (0,0035 ± 0,00068pmol/célula).

Na literatura ainda não foi descrito nenhum estudo que tenha verificado a concentração de glutathiona nas células do cumulus em suínos. Assim, comparando-se com os resultados de Furnus et al. (2008) na espécie bovina, onde a concentração de glutathiona foi de 0,00041pmol/10⁶ células, apresentamos neste trabalho valores muito maiores, em média 0,00026pmol/célula, indicando alta concentração de glutathiona nestas células. Este resultado é importante, pois se sabe que a concentração de glutathiona nas células do cumulus pode influenciar as concentrações oocitárias.

Há grande quantidade de HSP70 armazenada em oócitos em vesícula germinativa. Nossos resultados estão em concordância com Lánská et al. (2006). Estes autores demonstraram altas concentrações de HSP70 em oócitos de suínos com crescimento completo, isto é, provenientes de folículos entre 2-5mm. Isto também foi comprovado em outras espécies como camundongos por Liu et al. (2004) e bovinos por Edwards e Hansen (1996).

Lánská et al. (2006) demonstraram que os oócitos tiveram depleção da HSP70 até aproximadamente dois terços da concentração inicial após 6 horas de cultivo em meio de maturação, mas quando submetidos ao estresse térmico por 4 horas, a concentração decaiu para valores não detectáveis. Desta forma, os autores concluíram que a HSP70 é importante no processo de maturação meiótica e quando

os oócitos são expostos ao estresse térmico ou a outros tipos de estresse, a HSP70 previamente sintetizada é utilizada para proteção dos processos celulares.

Em nosso experimento, também houve diminuição das concentrações de HPS70 durante a maturação. Foi encontrada interação entre o efeito da atmosfera e da suplementação do meio de maturação, tendo o grupo suplementado com PFF apresentado maiores valores que o grupo PVA na atmosfera de 5% de O₂. Também foi verificado efeito da diminuição de HSP70 em oócitos que permaneceram em meio de maturação, já que todos os grupos maturados *in vitro* apresentaram menores índices que os grupos que não permaneceram em cultivo, grupos 0 hora e maturado *in vivo*.

Em seus estudos sobre a localização das HSP70 em oócitos de bovinos, Kawarkhy e King (2001) demonstraram que em 9 dos 11 oócitos em metáfase 2 houve marcação intensa desta proteína próximo à placa metafásica. Este fato não foi verificado em nosso experimento, pois em apenas 40% dos oócitos à 0 hora foi detectada esta proteína no núcleo dos oócitos, mesmo estando intensamente expressa neste grupo como descrito anteriormente. Os oócitos após 44 horas de maturação não apresentaram migração para próximo a placa metafásica, apenas em 55% dos oócitos houve migração para o corpúsculo polar. Segundo Kawarkhy e King (2001), a presença de HSP70 próximo a placa metafásica indicaria que esta proteína teria função de estabilizar esta estrutura, provavelmente tendo ação em microtúbulos.

A atmosfera de 20% de O₂ apresentou maiores índices de clivagem ($54,05 \pm 2,46\%$) que a atmosfera de 5% de O₂ ($48,50 \pm 2,46\%$). Porém não houve efeito da atmosfera nos índices de blastocistos. Kikuchi et al. (2002) após a fecundação *in vitro* e Iwamoto et al. (2005) após a ativação partenogénica também não verificaram diferenças na formação de blastocisto. Porém, nestes estudos, a qualidade embrionária medida pelo número total de células, foi maior em embriões provenientes de oócitos maturados em 5% de O₂. O que difere dos nossos resultados, nos quais a atmosfera de 20% de O₂ apresentou blastocistos com maior número de células.

A presença das células do cumulus e cisteína no meio de maturação podem atenuar o estresse oxidativo. Por isso atmosferas com 5% de O₂ não apresentam melhores resultados que as com 20% de O₂ (BING et al., 2002). Corrobora com este

fato a presença da cisteamina nos nossos meios de maturação. Quando a cisteamina é adicionada aos meios de maturação, ela promove a conversão de cistina à cisteína, principalmente em meio TCM 199, que possui altas concentrações de cistina (NAGAI et al., 2006).

As células do cumulus de oócitos maturados em PVA diferiram nas fases do ciclo celular do grupo 0 hora, apresentando maiores índices de células em divisão, o que não ocorreu nos grupos PFF. No entanto, não foi verificada diferença entre as suplementações do meio de maturação no número de células do cumulus por oócito após a maturação.

Krinner et al. (2009) demonstraram que células-tronco mesenquimais de camundongos apresentaram maiores índices de proliferação quando cultivadas em atmosfera contendo 5% de O₂. Estes autores explicam que este resultado ocorreu pela maior similaridade desta atmosfera com as condições fisiológicas. Nosso estudo demonstrou que houve um maior número de células em oócitos maturados em atmosfera com 5% de O₂, estando de acordo com Krinner et al. (2009) no fato que células somáticas apresentam maior proliferação nesta atmosfera. Não ter sido verificado efeito da atmosfera no ciclo celular destas células possivelmente deve-se ao fato de ter sido feita uma análise pontual. Para apresentar um número final maior de células, estas, em algum momento do período de maturação, passaram pelo processo de divisão. E sabe-se que este momento não foi às 44 horas.

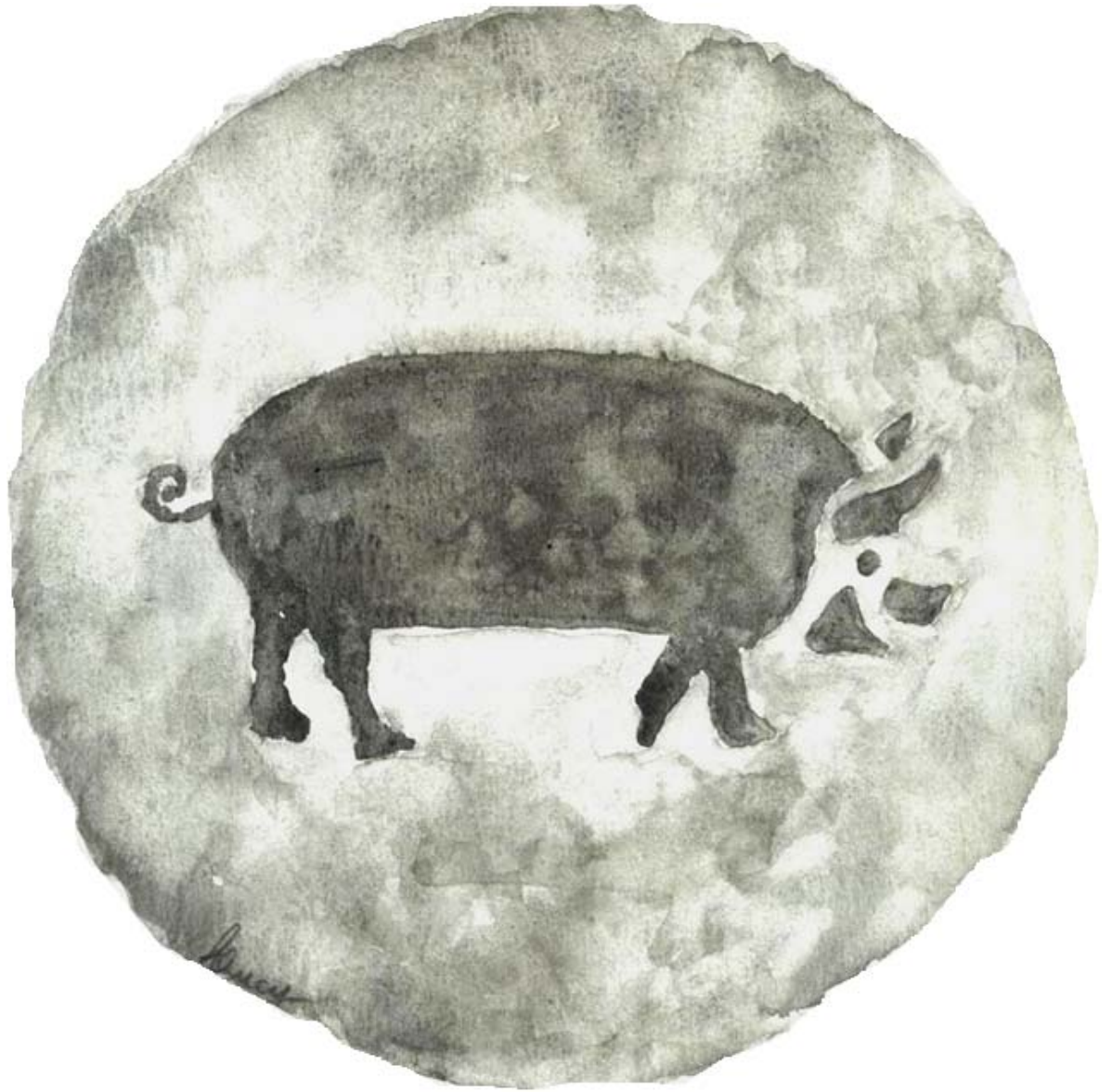
O maior número de células do cumulus ao final da maturação oocitária com atmosfera de 5% de O₂ poderia ser uma explicação para os menores índices de clivagem e qualidade dos blastocistos de oócitos provenientes deste grupo. Estas células, quando em excesso, podem competir com o oócito por substâncias presentes no meio como: aminoácidos, substratos energéticos e fatores de crescimento, o que prejudicaria a maturação citoplasmática do oócito, levando à diminuição dos índices de clivagem e qualidade dos blastocistos.

Não houve efeito nem da suplementação do meio de maturação nem da atmosfera na peroxidação lipídica de células/oócito, já que não foi verificada diferença nos índices de TBARS no meio em que ocorreu a maturação. Jozwik et al. (1999) observaram que em humanos foram encontrados valores de 740ng/ml de TBARS no fluido folicular. A média de TBARS no meio de maturação no presente estudo foi de 110,25ng/ml, indicando baixos índices de peroxidação lipídica.

Os níveis de TBARS após o teste de resistência das células ao estresse oxidativo tem correlação paralela com a morte celular, no entanto, não é afetado por pequenas alterações na temperatura ou tensões de oxigênio (CANTRILL et al. 1997). Assim, pode-se inferir que a diferença do estresse oxidativo dos nossos grupos experimentais foi muito pequena, não alterando as concentrações de TBARS.

Apesar da atmosfera com 5% de O₂ ter tido pouca influência nos parâmetros oocitários avaliados no presente estudo, ela foi prejudicial para índices importantes da produção *in vitro* de embriões suínos como os índices de clivagem e qualidade embrionária, indicando que algum efeito oocitário não mensurado deve ter sofrido alteração pelo uso desta atmosfera.

Resultados de estudos prévios já haviam demonstrado que meios suplementados com PVA eram adequados à maturação nuclear não diferindo de meio suplementados com PFF em atmosfera com 20% O₂ (MARQUES et al., 2007). No entanto, esperava-se que no presente estudo ocorresse um efeito sinérgico positivo da atmosfera de 5% de O₂ e da suplementação com PVA, elevando os índices de maturação, principalmente citoplasmática, o que não foi verificado.



7 CONCLUSÕES

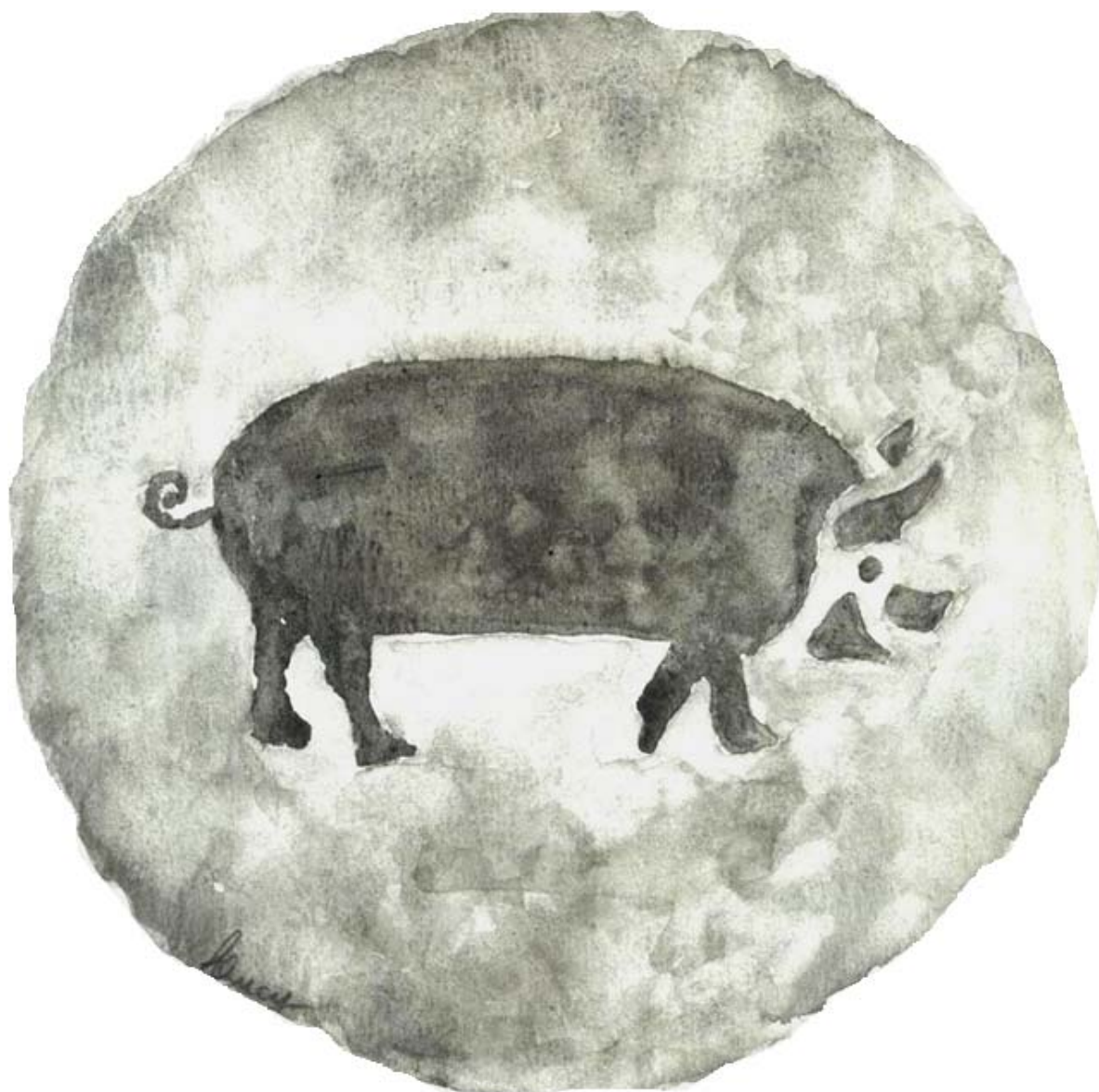
O uso da baixa tensão de O₂ diminuiu as concentrações de glutathiona nas células do cumulus, diminuiu os índices de clivagem, diminuiu o número total de blastômeros dos embriões produzidos e aumentou o número de células por oócito após o período de maturação *in vitro*.

A suplementação do meio de maturação com 0,1% de PVA diminuiu os índices de migração dos grânulos corticais, mas este fato não teve efeito nos índices de penetração espermática pós fecundação *in vitro*.

Houve diminuição dos estoques de HSP70 durante o período de maturação em todos os grupos de maturação *in vitro*.

As células do cumulus provenientes de oócitos maturados em meio suplementado com 0,1% de PVA apresentaram maior número de células na fase S e G2/M que o grupo 0 hora, mas isso não refletiu em um aumento no número de células por oócito após a maturação.

Portanto, o uso de baixa tensão de oxigênio não melhora as condições do sistema de maturação oocitária *in vitro* em suínos, e que seu efeito na maioria dos fatores avaliados independe da suplementação do meio de maturação.



REFERÊNCIAS

- ABEYDEERA, L. R. *In vitro* production of embryos in swine. **Theriogenology**, v. 52, p. 257-73. 2002.
- BASINI, G. A.; SIMONA, A. B.; SANTINI, S. E. A.; GRASELLI, F. G. Reactive oxygen species and anti-oxidant defences in swine follicular fluids. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, p. 269–274. 2008.
- BERNARDINI, C., FANTINATI, P.; ZANNONI, A.; FORNI, M.; TAMANINI, C.; BACCI, M. L. Expression of HSP70/HSC70 in swine blastocysts: effects of oxidative and thermal stress. **Molecular Reproduction and Development**, v. 69, p. 303-307. 2004.
- BERTAGNOLLI, A. C.; GONÇALVES, P. B. D.; GIOMETTI, I. C. L.; COSTA, F. S.; OLIVEIRA, J. F. C.; GONÇALVES, I. D. V.; BARRETO, K. P.; EMANUELLI, I. P.; BORGES, L. F. K. Interação entre células do cumulus e atividade da proteína quinase C em diferentes fases da maturação nuclear de oócitos bovinos. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 56, p. 488-96. 2004.
- BING, Y. Z.; HIRAO, Y.; CHE, M.; IGA, K.; TAKENOUCI, N.; KUWAYAMA, M.; FUCHIMOTO, D.; MARTINEZ, H. R.; NAGAI, T. *In vitro* maturation and glutathione synthesis of porcine in the presence or absence of cysteamine under different oxygen tensions: role of cumulus cells. **Reproduction Fertility and Development**, v. 14, p. 124-131. 2002
- BRAD, A. M.; BORMANN, C. L.; SWAIN, J. E.; DURKIN, R. E.; JOHNSON, A. E.; CLIFFORD, A. L. Glutathione and adenosine triphosphate content of *in vivo* and *in vitro* matured porcine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 64, p. 492-98. 2003.
- CANTRILL, R. C.; ELLS, G. W.; DEMARCO, A.C.; HORROBIN, D. F. Mechanisms of the selective cytotoxic actions of certain essential fatty acids. **Advanced Experiment Medicine Biology**, v. 400, p. 539-44. 1997.
- CHOI, W.; BANERJEE, J.; FALCONE, T.; BENA, J.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. K. Oxidative stress and tumor necrosis factor- α -induced alterations in metaphase II mouse oocyte spindle structure. **Fertility and Sterility**, v. 88, p. 1220-31. 2007.
- DAUGAARD, M.; ROHDE, M. JAATTELA, M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. **FEBS Letters**, v. 581, p. 3702–10. 2007.
- DE MATOS, D. G.; GASPARRINI, B. PASQUALINI, S. R.; THOMPSON, J.G. Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. **Theriogenology**, v. 57, p. 1443-51. 2002.

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

EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Molecular Reproduction and Development**, v. 46, p. 138-145. 1997.

FEDER, M. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Reviews Physiology**, v. 61, p. 243-82. 1999.

FEUGANG, J. M.; ROOVER, R. D.; MOENS, A.; LÉONARD, S.; DESSY, F.; DONNAY, I. Addition of β -mercaptoethanol stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by peroxidant agents. **Theriogenology**, v. 61, p. 71-90. 2004.

FICHER, B.; BAVISTER, B. D.; Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 673-9, 1993.

FUNAHASHI, H. Polyspermic penetration in porcine IVM-IVF systems. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 15, p. 167-77. 2003.

FUNAHASHI, H.; CANTLEY, T. C.; STUMPF, T. T.; TERLOUW, S. T.; DAY, B. N. *In vitro* development of Vitro-matured porcine oocytes following chemical activation or *in vitro* fertilization. **Biology and Reproduction**, v. 50, p. 1072-77, 1994.

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

GIL, M. A.; RUIZ, M.; CUELLO, C.; VAZQUEZ, J. M.; ROCA, J.; MARTINEZ, A. E. Influence of sperm:oocyte ratio during *in vitro* matured cumulus-intact pig oocytes on fertilization parameters and embryo development. **Theriogenology**, v. 61, p. 551-60. 2004.

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

HONG, J. Y.; YONG, H. Y.; LEE, L. C.; HWANG, W. S.; LIM, M. J.; LEE, E. S. Effects of amino acids on maturation, fertilization and embryo development of pig follicular oocytes in two IVM media. **Theriogenology**, v. 62, p. 1473-1482. 2004.

IAMOTO, M. A.; ONISHI, D.; FUCHIMOTO, T.; SOMFAI, K.; TAKEDA, T.; TAGAMI, H.; HAMADA, J.; NOGUCHI, H.; KANEKO, T.; NAGAI, T.; KIKUCHI, K. Low oxygen tension during *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes improves parthenogenetic activation and subsequent development to blastocyst stage. **Theriogenology**, v. 63, p. 1277-1289. 2005.

IM, G. S.; LIANGXUE, L.; LIU, Z.; HAO, Y.; WAX, D.; BONK, A.; PRATHER, R. S. *In vitro* development of preimplantation porcine nuclear transfer embryos cultured in different media and gas atmospheres. **Theriogenology**, v. 61, p. 1125- 1135, 2004.

IZADYAR F., COLEMBRANDER B., BEVERS M. M.: "Stimulatory effect of growth hormone on *in vitro* maturation of bovine oocytes is exerted through the cyclic adenosin 3', 5'- monophosphate signaling pathway". **Biology and Reproduction**, v. 57, p. 1484-1489, 1997.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 9, p. 515-40. 1990.

JOZWIK, M.; WOLCZYNSKI, S.; JOZWIK, M.; SZAMATOWICZ, M. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, p. 409-13. 1999.

KARJA, N. W. N.; WONGSRIKEAO, P.; MURAKAMI, M.; AGUNG, B.; FAHRUDIN, M.; NAGAI, T.; OTOI, T. Effects of tension on the development and quality of porcine *in vitro* fertilized embryos. **Theriogenology**, v. 62, p. 1585-95, 2004.

KAWARSHY, S. J.; KING, W. A. Expression and localization of heat shock protein 70 in cultured bovine oocytes and embryos. **Zygote**, v. 9, p. 39-50. 2001.

KIKUCHI, K.; ONISHI, A.; KASHIWAZAKI, N.; IWAMOTO, M.; NOGUCHI, J.; KANEKO, H.; AKITA, T.; NAGAI, T. Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified *in vitro* system. **Biology Reproduction**, v. 66, p. 1033-41. 2002.

KISHIDA, R.; LEE, E. S.; FUKUI, Y. *In vitro* maturation of porcine oocytes using a defined medium and development capacity after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology**, v. 62, p. 1663-76. 2004.

KITAGAWAA, Y.; KEITA, S.; YONEDA, A.; WATANABE, T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. **Theriogenology**, v. 62, p. 1186-97. 2004.

KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The physiology of Reproduction**. 2 ed. New York, Raven Press, 1992.

KRINNER, A.; ZSCHARNACK, N.; BADER, A.; DRASDO, D.; GALLE, J. Impact of oxygen environment on mesenchymal stem cell expansion and chondrogenic differentiation. **Cell Proliferation**, v. 42, p. 471-84. 2009.

LÁNSKÁ, V.; CHMELÍKOVÁ, E.; SEDMÍKOVÁ, M.; PETR, J.; RAJMON, R.; JESETA, M.; ROZINEK, J. Expression of heat shock protein 70 in pig oocytes: heat shock response during oocyte growth. **Animal Reproduction Science**, v. 96, p. 154-164. 2006.

LIU, C.H., YANG, C. C.; LIN, D.P.C.; TSAI, K. J. Stored of HSP72/HSP73 in Germal Vesicle-stage mouse oocytes. **Reproduction Domestic Animal**, v. 39 p. 19-24. 2004.

LONERGAN, P.; DINNYES, A.; FAIR, T.; YANG, X. BOLAND, M. Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with Butyrolactone I. **Molecular Reproduction and Development**, n. 1, v. 57, p. 204-209, 2000.

LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reproduction Biology**, v. 5, p. 5-17. 2005

MAEDOMARI, N.; KIKUCHI, K.; OZAWA, M.; NOGUCHI, J.; KANEKO, H.; OHNUMA, K.; NAKAI, M.; SHINO, M.; NAGAI, T.; KASHIWAZAKI, N. Cytoplasmic glutathione regulated by cumulus cells during porcine oocyte maturation affects fertilization and embryonic development *in vitro*. **Theriogenology**, v. 67, p. 983–993, 2007.

MARQUES, M. G.; NICACIO, A. C.; OLIVEIRA, V. P.; NASCIMENTO, A. B.; CAETANO, H. V. A.; MENDES, C. M.; MELLO, M. R. B.; MILAZZOTTO, M. P.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A.; VISINTIN, J. A. *In vitro* maturation of pig oocytes with different media, hormone and meiosis inhibitors. **Animal Reproduction Science**, v. 97, p. 375–381. 2007.

MATÁS, C.; COY, P.; ROMAR, R.; MARCO, M.; GADEA, J.; RUIZ, M. Effect of sperm preparation method on *in vitro* fertilization in pigs. **Reproduction**, v. 125, p. 133-41. 2003.

MATWEE, C.; KAMARUDDIN, M.; BETTS, D. H.; BARRUR, P. K.; KING, W. A. The effects of antibodies to heat shock protein 70 in fertilization and embryo development. **Molecular Human Reproduction**, v. 7, p. 829-37. 2001.

MEISTER, A. Glutathione metabolism and its selective modification. **Journal of Biology Chemistry**, v. 263, p. 17205-08. 1988.

MOTLIK, J.; KUBELKA, M., Activation of Mammalian Oocytes as an Essential Step for nem Biotechniques. **Arquivo da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 27, p. 89-99, 1999.

NEUER, A.; SPANDORFER, S. D.; GIRALDO, P.; DIETERLE, S.; ROSENWAKS, Z.; WITKIN, S. S. The role of heat shock proteins in reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 6, p. 149-59. 2000.

NICHI, M. **Sistemas de produção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídeos seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de dourados, MS.** São Paulo, 2003. 101f. Dissertação (Mestrado em reprodução animal). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

OZAWA, M.; NAGAI, T.; FAHRUDIN, M.; KARJA, N. W. K.; KANEKO, H.; NOGUCHI, J.; OHNUMA, K.; KIKUCHI, K. Addition of glutathione or thioredoxin to culture medium reduces intracellular redox status of porcine ivm/ivf embryos, resulting in improved development to the blastocyst stage. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 998–1007. 2006.

ROVER JR, L.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A.P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathiona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, p. 112-19. 2001.

SIROTKIN, A. V.; DUKESOVA, J.; MAKAREVICH, A. V.; KUBEK, A.; BULLA, J. Evidence that growth factors IGF-I, IGF-II and EGF can stimulate nuclear maturation of porcine oocytes via intracellular protein kinase A. **Reproduction, nutrition and development**, v. 40, n. 6, p.559-569, 2000.

SONFAI, T.; OZAWA, M.; NOGUCHI, J.; KANEKO, H.; KARJA, N. W. K.; MOKHAMAD FAHRUDIN, M.; NAKAI, A.; MAEDOMARIC, A.; DINNY´ES, A.; NAGAI, T.; KIKUCHI, K. *In vitro* development of polyspermic porcine oocytes: Relationship between early fragmentation and excessive number of penetrating spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 131–47. 2008.

SOOM, A. V.; YUAN, Y. Q.; PEELMAN, L. J.; DE MATOS, D. G.; DEWULF, J.; LAESENS, H.; DE KRUIF, A. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos culture under different oxygen tensions with ou withot cysteine addition. **Theriogenology**, v. 57, p. 1453-65. 2002.

SUM, Q.; LAI, L.; BONK, A.; PRATHER, R. S.; SCHATTEEN, H. Cytoplasmic changes in relation to nuclear maturation and early embryo developmental potencial of procine oocytes: effects of gonadotropins, cumulus cells, follicular size, and protein synthesis inhibition. **Molecular Reproduction and development**, v. 59, p. 192-198, 2001.

SCHUTTE, B.; NIELAND, L.; ENGELAND, M. V.; HENFLING, E. R.; MEIJER, L; RAMAEKERS, F. C. S. The effect of cyclin-dependent kinase inhibitor olomoucine on cell cycle kinetics. **Experimental Cell Research**, v. 236, n.1, p. 4-15, 1997.

SUZUKI, H.; SAITO, Y.; KAGAWA, N.; YANG, X. *In vitro* and polyspery in the pig: factors affecting fertilization rates and cytoskeletal reorganization of the oocyte. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, p. 327-34. 2003.

TATEMOTO, H.; MUTO, N.; SUNAGAWA, I.; SHINJO, A.; NAKADA. Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. **Biology and reproduction**, v. 71, p. 1150-57, 2004.

TATEMOTO, H.; TERADA, T. Analysis of zona pellucida modifications due to cortical granule exocytosis in single porcine oocytes, using enhanced chemiluminescence. **Theriogenology**, v. 52, p. 629-640. 1999.

WANG, W. H.; SUM, Q. Y.; HOSOE, M.; SHIOYA, Y.; DAY, B. N. Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. **Biology and reproduction**, v. 56, p. 1376-82. 1997.

WHITAKER, B. D.; KNIGHT, J. W. Exogenous γ -glutamyl cycle compounds supplemented to *in vitro* maturation medium influence *in vitro* fertilization, culture and embryos parameters of porcine oocytes and embryos. **Theriogenology**, v. 62, p. 311-22. 2004.

WU, G. M.; SUM, Q. Y.; MAO, J.; LAI, L.; McCAULEY, T. C.; PARK, K. W.; PRATHER, R. S.; DIDION, B. A.; DAY, B. N. High development competence of pig oocytes after meiotic inhibition with a specific M-phase promoting factor kinase inhibitor, Butyrolactone I. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 1, p. 170-177, 2002.

YOSHIBA, M.; ISHIZAKI, Y.; KAWAGISHI, H.; KOJIMA, Y. Effects of pig fluid on maturation of pig oocytes *in vitro* and on their subsequent fertilizing and development capacity *in vitro*. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 95, n. 2, 1992

YOSHIOKA, K.; SUZUKI, T.; ANAS, I. M. K.; IWAMURA, S. Birth of piglets derived from porcine zygotes culture in chemically defined medium. **Biology and reproduction**, v. 66, p. 112-9, 2002.

YONEDA, A.; SUZUKI, K.; MORI, T.; UEDA, J.; WATANABE, T. Effects of delipidation and oxygen concentration on *in vitro* development of porcine embryos. **Journal Reproduction and Development**, v. 50, p. 277-295. 2004.

YOSHIDA M.; ISHIZAKI, Y.; KAWAGISHI, H.; KOJIMA, Y. Effects of pig fluid on maturation of pig oocytes *in vitro* and on their subsequent fertilizing and development capacity *in vitro*. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 95, p. 481-88. 1992.

ZHANG, L.; JIANG, S.; WOZNIAK, P.J. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development *in vitro*. **Molecular Reproduction Development**, v. 40, p. 338-344. 1995.

ZUELKE, K. A.; JONES, D. P.; PERREAULT, S. D. Glutathione oxidation is associated with altered microtubule function and disrupted fertilization in mature hamster oocytes. **Biology and Reproduction**, v. 57, p.1413-19. 1997.

ANEXOS

ANEXO A - MEIO DE LAVAGEM (Meio Hepes buffered Tyrode's – HbT)

Componente	Marca/ nº de catálogo	Concentração
NaCl	Sigma s-5886	113,7mM
NaHCO ₃	Sigma s-5761	2mM
Na Lactate	Sigma l-4388	12,95mM
Na Pyruvate	Sigma p-4562	0,2mM
NaH ₂ PO ₄	Sigma s-5136	0,34mM
KCL	Sigma p-5405	3,22mM
CaCl ₂ 2H ₂ O	Sigma c-7902	2,04mM
MgCl ₂ 6H ₂ O	Sigma m-2393	0,5mM
Hepes	Sigma h-0891	10mM
BSA V	Sigma a-8022	3mM
SFB	Nutricell	10%
Phenol Red	Sigma p-4633	0,027mM

ANEXO B - MEIOS DE MATURAÇÃO

Componentes	Marca/ nº de catálogo	Concentração	
		TCM 199 + PFF	TCM199 + PVA
Piruvato de Sódio	Sigma p-4562	0,91mM	0,91mM
Cisteína	Sigma c-7352	0,57mM	0,57mM
Cisteamina	Sigma m-9768	50µM	50µM
D-Glicose	Sigma g-6152	3,05 mM	3,05 mM
EGF	Sigma e-4127	50Ui/mL	50Ui/mL
HCG	Intervet	10Ui/mL	10Ui/mL
ECG	Intervet	10Ui/mL	10Ui/mL
Gentamicina	Sigma g-1264	50Ui/mL	50Ui/mL
Álcool polivinílico	Sigma p-8136	—	0,10%
Fluído Folicular Suíno	—	10%	—

Produção do Fluído folicular suíno

Para obtenção do PFF, folículos de 2-6mm de ovários suínos provenientes de matadouro foram aspirados com auxílio de agulha 18G e seringa de 5mL. Após 10 minutos de sedimentação, o sobrenadante foi retirado e centrifugado 6000 x g por 30 minutos. O sobrenadante foi retirado e filtrado em filtro de 0,80micra e posteriormente em filtro de 0,22micra. O fluído folicular resultante foi alíquotado e armazenado a -20°C até o momento do uso.

ANEXO C – PERCOLL

Percoll	Marca/ nº de catálogo	0,9 ml
Solução 10x	Tabela abaixo	100µL
NaHCO ₃	Sigma s-5761	28,57 mM
Ácido Lático Syrup (1M)	Sigma l-4388	3,7µL
MgCl ₂ 6H ₂ O (0,1M)	Sigma m-2393	3,9µL
CaCl ₂ 2H ₂ O (1M)	Sigma c-7902	2µL

Solução 10x	Marca/ nº de catálogo	100 µL
KCl	Sigma p-4504	1000 mM
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Sigma s-5011	100 mM
NaCl	Sigma s-5886	800,137 mM
HEPES	Sigma h-6147	99,87 mM
H ₂ O MiliQ		100 µL

ANEXO D - MEIO DE FECUNDAÇÃO (Tris Buffered Medium modificado)

Componentes	Marca/ nº de registro	Concentração
NaCl	Sigma s-5886	113,10mM
KCl	Sigma p-5405	3,00mM
CaCl ₂	Sigma c-7902	7,50mM
Glicose	Sigma g-1514	11,00mM
Piruvato de Sódio	Sigma p-4562	5,00mM
Tris	Sigma t-6791	20,00mM
Cafeina	Sigma c-0750	2,00mM
Cisteína	Sigma m-9768	0,57mM
BSA FAF	Sigma a-6003	2mM

ANEXO E - MEIO DE CULTIVO (Porcine Zygote Medium)

Componentes	Marca/ nº de registro	PZM – 3 + BSA
NaCl	Sigma s-5886	108,00mM
KCl	Sigma p-5405	10,00mM
Ca lactato	Sigma c-8356	2,00mM
KH ₂ PO ₄	Sigma p-5655	0,35mM
MgSO ₄ 7H ₂ O	Sigma m-9397	0,40mM
NaHCO ₃	Sigma s-5761	25,07mM
Glutamina	Sigma g-8540	1,0mM
Hipotaurina	Sigma h-1384	5,0mM
Gentamicina	Sigma G-1264	50Ui/mL
BSA FAF	Sigma a-6003	3mg/mL
Aminoácidos Essenciais	Sigma M7145	20,00mL/L
Aminoácidos não Essenciais	Sigma B6766	10,00mL/L

