

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS DE CANINOS (*Canis familiaris*) NA  
PRESENÇA DE CISTEÍNA E  $\alpha$  – TOCOFEROL

LIZIANE FERRARESI HOLANDA CAVALCANTE

PORTO ALEGRE

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS DE CANINOS (*Canis familiaris*) NA  
PRESENÇA DE CISTEÍNA E  $\alpha$  – TOCOFEROL

Autora: Liziane Ferraresi Holanda Cavalcante

Dissertação apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do Grau de Mestre em Ciências Veterinárias  
na área de Reprodução Animal

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Rodrigues

PORTO ALEGRE

2009

*Aos meus pais*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, pelo amor incondicional, carinho e suporte durante toda essa etapa, eles que sempre me apoiaram e me incentivaram a nunca desistir frente às dificuldades.

Ao Prof. Dr. José Luiz Rodrigues pela oportunidade de realizar este projeto, apoio e orientação.

À Profa. Dra. Berenice de Ávila Rodrigues pelos ensinamentos, ajuda e paciência durante a realização dos experimentos e delineamento deste trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e seu corpo docente por sua alta qualificação profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos para a realização do curso de mestrado.

Aos colegas, bolsistas, estagiários e funcionários do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução agradeço pela colaboração.

Ao colega e amigo Artur Emílio Freitas e Silva, pela paciência e apoio profissional durante toda essa jornada.

Aos professores, residentes e funcionários do Hospital de Clínicas Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a toda a equipe do Centro de Controle de Zoonozes de Prefeitura Municipal de Porto Alegre, aos colegas da Clínica Veterinária do Vale e Clínica Veterinária Bicho Mania pela atenção dispensada na coleta dos ovários utilizados no experimento.

Aos meus amigos, que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.

## RESUMO

O desenvolvimento de meios de cultivo eficazes para a maturação *in vitro* de oócitos caninos tem sido um desafio para os pesquisadores em reprodução animal. O estresse oxidativo desempenha papel fundamental na maturação oocitária, uma vez que altas concentrações de espécies reativas ao oxigênio levam ao dano celular e apoptose. O objetivo desta pesquisa foi determinar as taxas de maturação nuclear de oócitos caninos na presença de cisteína e  $\alpha$ -tocoferol, substâncias conhecidas por suas propriedades antioxidantes. No experimento 1, avaliou-se a taxa de maturação nuclear de oócitos caninos mantidos em meio TCM-199 modificado (A) (controle) ou acrescido de 0,57mM de cisteína (B). No experimento 2, determinou-se as taxas de maturação nuclear na presença de diferentes concentrações de  $\alpha$ -tocoferol em duas etapas independentes: experimento 1 (0, 10, 50 $\mu$ M) e experimento 2 (0, 100 e 500 $\mu$ M). Os dados foram analisados pelo teste do Qui-quadrado ( $P < 0,05$ ). No experimento 1, não foi observada diferença estatística entre as taxas de Metáfase I/Anáfase I (MI/AI) e Metáfase II (MII) entre os oócitos do grupo controle (A) (7,5%, 16/213; 1,9%, 4/213) e os oócitos do grupo acrescido de cisteína (B) (6,3%, 14/223; 0,9%, 2/223). No experimento 2, não houve diferença significativa nas taxas de MI e MII dos oócitos entre os tratamentos da primeira etapa: controle (26,8%, 29/108), 10 $\mu$ M (22,6%, 26/115) e 50 $\mu$ M (29,1%, 30/103). Na segunda parte do experimento, a percentagem de oócitos que retomaram a meiose (VGBD à MII) foi de 31,9% (31/97), 34,9% (39/112) e 51,5% (54/105) para os grupos controle, 100 e 500 $\mu$ M de  $\alpha$ -tocoferol respectivamente ( $P < 0,05$ ). Entretanto, nenhum aumento nas taxas de MII foi observado quando foram utilizadas as concentrações de 100 $\mu$ M (0,9%, 1/112) ou 500 $\mu$ M (1,0%, 1/105) de  $\alpha$ -tocoferol no meio. Concluiu-se que, o TCM-199 modificado suplementado com cisteína não foi eficaz em elevar os índices de maturação *in vitro* de oócitos caninos. Ainda, a suplementação de  $\alpha$ -tocoferol não afetou as taxas de MII de oócitos caninos.

**Palavras-chave:** canino, oócito, maturação *in vitro*, estresse oxidativo

## ABSTRACT

*The development of effective culture media for in vitro maturation of canine oocytes has been a challenge for researchers in animal reproduction. Oxidative stress plays a critical role in oocyte maturation since high concentrations of reactive oxygen species lead to cell damage and apoptosis. This research aimed to determine the rates of nuclear maturation of canine oocytes in the presence of cysteine and  $\alpha$ -tocopherol, substances known for its antioxidant properties. In experiment 1, the rates of oocytes nuclear maturation exposed to modified TCM-199 (A) (control) or added with 0.57mM cysteine (B) were evaluated. In experiment 2, the rates of oocytes nuclear maturation in the presence of different concentrations of  $\alpha$ -tocopherol were determined in two independent essays: experiment 1 (0, 10 and 50 $\mu$ M) and experiment 2 (0, 100 and 500 $\mu$ M). Data were analyzed by the Chi-square test ( $P < 0.05$ ). The data obtained in experiment 1 allowed no difference among the oocytes in Metaphase I/Anaphase (MI/AI) (7.5%, 16/213; 1.9%, 4/213) and Metaphase II (MII) (6.3%, 14/223; 0.9%, 2/223) rates observed in the medium without or supplemented with cysteine respectively. In experiment 2, there was no significant difference in the rates of MI and MII oocytes among treatments designed for the first essay: control (26.8%, 29/108), 10 $\mu$ M (22.6%, 26/115) and 50 $\mu$ M (29.1%, 30/103). In the second part of the experiment, the percentage of oocytes that resumed meiosis (GVBD to MII) was 31.9% (31/97), 34.9% (39/112) and 51.5% (54/105) for control, 100 and 500 $\mu$ M groups respectively ( $P < 0.05$ ). However, no improvement on rates of MII was observed when either 100 or 500 $\mu$ M  $\alpha$ -tocopherol was added in medium. It was concluded that, modified TCM-199 supplemented with cysteine, was not effective in raising the rates of in vitro maturation of bitch oocytes. Moreover,  $\alpha$ -tocopherol supplement did not affect the rates of MII in canine oocytes.*

**Key words:** *canine, oocyte, in vitro maturation, oxidative stress*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg	micrograma(s)
µL	microlitro(s)
µM	micromolar
µmol	micromol
AI	anáfase I
AMPc	cyclic adenosine monophosphate (adenosina monofosfato cíclica)
ATP	adenosine triphosphate (adenosina trifosfato)
BCB	brilliant cresil blue (azul cresil brilhante)
BME	β-mercaptoetanol
BSA	bovine serum albumin (albumina sérica bovina)
CIS	cisteína
CIV	cultivo <i>in vitro</i>
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
COC(s)	<i>Cumulus</i> -oocyte complex (s) (complexo cumulus oócito) (s)
CTA	capacidade total antioxidante
Cu	cobre
CYS	cysteine (cisteína)
DNA	deoxyribonucleic acid (ácido desoxiribonucléico)
DO(s)	denuded oocyte(s) (oócito desnudo)(s)
EGF	epidermal growth factor (fator de crescimento epidérmico)
Fas-Fas	sistema ligante do antígeno Fas
Fe	ferro
FF	fluido folicular
FITC-LCA	fluorescein isothiocyanate conjugated lens culinaris agglutinin (lens culinaris aglutinina conjugada ao isocianato de fluoresceína)
FIV	fecundação <i>in vitro</i>
FSH	follicle stimulating hormone (hormônio folículo estimulante)
G2/M	fase G2 do crescimento celular e mitose
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase)
GSH	glutathione (glutaciona)
GV	germinal vesicle (vesícula germinativa)

GVBD	germinal vesicle breakdown (quebra de vesícula germinal)
hCG	human chorionic gonadotropin (gonadotrofina coriônica humana)
HO <sub>2</sub>	radical hidroperoxil
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
hST	human somatotropin (somatotrofina humana)
ICSI	intracytoplasmic sperm injection (injeção intracitoplasmática de espermatozóide)
IVC	<i>in vitro</i> culture (cultivo <i>in vitro</i> )
IVF	<i>in vitro</i> fertilization (fecundação <i>in vitro</i> )
IVM	<i>in vitro</i> maturation (maturação <i>in vitro</i> )
IVP	<i>in vitro</i> production (produção <i>in vitro</i> )
LH	luteinizing hormone (hormônio luteinizante)
MI	metáfase I
MII	metáfase II
MAP quinase	mitogen activated protein kinase (Proteína-quinase ativada por mitógeno)
MEM	meio essencial mínimo
mg	miligrama(s)
MIV	maturação <i>in vitro</i>
mL	mililitro(s)
mM	milimolar
mmol	milimol
MPF	maturation promoting factor (fator promotor da maturação)
mRNA	messenger ribonucleic acid (ácido ribonucleico mensageiro)
mSOF	modified synthetic oviduct fluid (fluido sintético de oviduto modificado)
NAC	<i>N</i> -acetil- <i>L</i> -cisteína
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato)
NCSU23	North Carolina State University medium 23
NF-κB	Nuclear factor-kappa B (fator de transcrição nuclear kappa B)
ng	nanograma(s)
NO	nitric oxide (óxido nítrico)
O <sub>2</sub>	superóxido
OH <sup>-</sup>	radical hidroxil



PBS	phosphated buffered saline (solução salina fosfatada)
PFM	paraformaldeído
PIV	produção <i>in vitro</i>
pM	picomolar
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate (forbol 12-miristato 13-acetato)
PVP	polivinil-pirrolidona
ROS	reactive oxygen species (espécies reativas ao oxigênio)
SCNT	somatic cell nuclear transfer (transferência nuclear de célula somática)
Se	selênio
SFB	soro fetal bovino
SOD	superóxido dismutase
TCM-199	tissue culture medium 199 (meio de cultivo tecidual 199)
TE	trofoectoderma
TMZ	transcrição do genoma materno para o do zigoto
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
XOD	xanthine oxidase (xantina oxidase)
ZP	zona pelúcida

## LISTA DE TABELAS

### Experimento 1

Tabela 1 -	Maturação nuclear <i>in vitro</i> de oócitos caninos expostos à CIS .....	46
------------	--	----

### Experimento 2

Tabela 1 -	The <i>in vitro</i> maturation rates of canine oocytes exposed to 10 or 50µM α-tocopherol.....	61
Tabela 2 -	The <i>in vitro</i> maturation rates of canine oocytes exposed to 100 or 500µM α-tocopherol.....	62

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
<b>2.1</b>	<b>Maturação <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i></b> .....	17
<b>2.2</b>	<b>O estresse oxidativo e as substâncias antioxidantes</b> .....	21
2.2.1	Os compostos Tiois.....	25
2.2.2	A vitamina E.....	35
<b>3</b>	<b>ARTIGOS</b>	
<b>3.1</b>	<b>USO DA CISTEÍNA NA MATURAÇÃO NUCLEAR <i>IN VITRO</i> DE OÓCITOS CANINOS</b> .....	41
	RESUMO.....	41
	ABSTRACT.....	42
	INTRODUÇÃO.....	42
	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
	RESULTADOS.....	45
	DISCUSSÃO.....	46
	CONCLUSÃO.....	51
	AGRADECIMENTOS.....	51
	REFERÊNCIAS.....	51
<b>3.2</b>	<b><i>IN VITRO</i> NUCLEAR MATURATION OF CANINE OOCYTES IN THE PRESENCE OF <math>\alpha</math>-TOCOPHEROL</b> .....	56
	ABSTRACT.....	56
	INTRODUCTION.....	57
	MATERIALS AND METHODS.....	59
	Ovaries and COCs collection.....	59
	<i>In vitro</i> maturation.....	60
	Assessment of nuclear maturation.....	60
	Statistical analysis.....	61
	RESULTS.....	61
	DISCUSSION.....	62
	ACKNOWLEDGEMENTS.....	65
	REFERENCES.....	65

<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>69</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>
	ANEXO A – Protocolo de maturação <i>in vitro</i> e coloração de oócitos de caninos.....	82
	ANEXO B – Protocolo para diluição e confecção das alíquotas de $\alpha$ -tocopherol.....	84

## 1 INTRODUÇÃO

As biotécnicas de reprodução assistida tais como a inseminação artificial (IA), a maturação *in vitro* de gametas (MIV), a fecundação *in vitro* (FIV), o cultivo *in vitro* de embriões (CIV), além da criopreservação de gametas e de embriões, têm como objetivo a maximização do desempenho reprodutivo das espécies animais. Em canídeos, a utilização dessas biotécnicas tem despertado interesse da comunidade científica, levando-se em consideração aspectos de conservação da biodiversidade. Dessa forma, o cão doméstico (*Canis familiaris*) tem sido utilizado como modelo experimental para estudos da fisiologia da reprodução de espécies de canídeos ameaçadas de extinção, tais como o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e o cachorro-do-mato (*Speothos venaticus*), além de ser uma valiosa ferramenta para o estudo e introdução de novos métodos de controle populacional como opção à castração cirúrgica.

Nas últimas décadas, com o desenvolvimento de novas tecnologias, como a produção de animais transgênicos e clones, além das adequações e aprimoramentos das técnicas existentes, tem se buscado estabelecer as reais necessidades dos gametas caninos durante a MIV e FIV. Diversos fatores têm sido examinados, incluindo a adição ou remoção de componentes do meio, como proteínas, esteróides, gonadotrofinas, hormônios, fatores de crescimento, fluido e/ou células do oviduto, antioxidantes, assim como a seleção oocitária baseada no estado reprodutivo da fêmea no momento da colheita ovariana, no intuito de melhorar os resultados, que até agora têm se apresentado muito variáveis e pouco expressivos.

Nos últimos cinco anos, o Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da Faculdade de Veterinária da UFRGS têm realizado diferentes experimentos com o objetivo de determinar um meio de cultivo ideal para os gametas caninos e conseqüentemente otimizar os resultados de maturação e fecundação *in vitro* nessa espécie. Dessa forma, a utilização de diferentes suplementações hormonais e protéicas (RODRIGUES e RODRIGUES, 2003b; RODRIGUES *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2007), a adição de ácido hialurônico (RODRIGUES *et al.*, 2006), a adição do polímero sintético polivinil-pirrolidona (SANTOS *et al.*, 2006), além da avaliação da influência do estado reprodutivo da fêmea canina na MIV e FIV de oócitos caninos (RODRIGUES e RODRIGUES, 2003a; RODRIGUES *et al.*, 2004) foram trabalhos realizados na tentativa de se alcançar um maior sucesso das técnicas *in vitro* na espécie. Além disso, recentemente avaliou-se o comportamento e os níveis de

impregnação do azul brilhante cresil em oócitos imaturos oriundo de cadelas apresentando perfis reduzidos e elevados de progesterona, com o objetivo de selecionar oócitos com melhor competência meiótica (RODRIGUES *et al.*, 2008). Igualmente, avaliou-se a viabilidade das células do *cumulus* de oócitos derivados de cadela pré-púberes e adultas em tempos diferentes de maturação (RODRIGUEZ *et al.*, 2008) e ainda a influência da tensão de oxigênio na viabilidade das células do *cumulus* em um meio apresentando alta concentração de glicose (11mM de glicose) (SILVA *et al.*, 2008).

Segundo Byers *et al.* (1992), a maturação oocitária *in vitro* é um processo complexo em que a tentativa principal é mimetizar as mudanças dinâmicas que acontecem no folículo ovariano pré-ovulatório. Um sistema de maturação bem sucedido deve possibilitar o desenvolvimento de todos os componentes do complexo *cumulus*-oócito (COC), incluindo as células do *cumulus*, o material nuclear e o citoplasma. Entretanto, da coleta até o cultivo, os oócitos são expostos à luz, submetidos a altas concentrações de oxigênio e transtornos nas concentrações de substratos metabólicos, resultando no estresse oxidativo e conseqüentemente no insucesso das técnicas de reprodução assistida *in vitro*.

O papel do estresse oxidativo nas técnicas de reprodução assistida em outras espécies, como na humana, já é bem estabelecido. Sabe-se que o CIV resulta na formação de altas concentrações de espécies oxigênio reativas (ROS), que levam à peroxidação lipídica das membranas, alterações mitocondriais, bloqueio celular embrionário, dano celular e apoptose, afetando o processo de maturação oocitária, fecundação e desenvolvimento embrionário. Apesar disso, as ROS servem como moléculas sinalizadoras em processos fisiológicos, sendo necessárias em baixas concentrações na célula (AGARWAL *et al.*, 2005). Dessa forma, a homeostasia celular, ponto chave para a produção de gametas e embriões viáveis, só é alcançada quando ocorre equilíbrio entre a produção de pró-oxidantes e a neutralização pelos antioxidantes (AGARWAL *et al.*, 2008).

Vários antioxidantes têm sido adicionados aos meios de MIV com objetivo de minimizar os efeitos do estresse oxidativo, tais como a cisteína (ALI *et al.*, 2003; KISHIDA *et al.*, 2004; LINH *et al.*, 2007), cisteamina (CHEN *et al.*, 2005; BALASUBRAMANIAN e RHO, 2007; SONG e LEE, 2007),  $\beta$ -mercaptoetanol (ABEYDEERA *et al.*, 1998; FUNAHASHI, 2005; LUVONI, 2006), ácido ascórbico (vitamina C) (OLSON e SEIDEL, 2000; HOSSEIN *et al.*, 2007a),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina

E) (KITAGAWA *et al.*, 2004; TAO *et al.*, 2004; LIMA VERDE, 2006), e até mesmo a água de côco (vitaminas A e E) (COSTA *et al.*, 2006). Em cães, todavia, o emprego de antioxidantes no meio de MIV ainda é pouco expressivo. Até o presente momento, apenas quatro trabalhos avaliaram a adição dos compostos tióis cisteína, cisteamina e  $\beta$ -mercaptoetanol na maturação *in vitro* de oócitos caninos. Excetuando-se o estudo de Pires (2006), três obtiveram resultados positivos, uma vez que, a adição desses compostos proporcionou o aumento das taxas de oócitos que alcançaram o estágio de metáfase II (MII) (KIM *et al.*, 2004; HOSSEIN *et al.*, 2007b; KIM *et al.*, 2007). Isto sugere que, a adição de antioxidantes ao meio de maturação fornece melhores condições de cultivo, influenciando a síntese de DNA nas células do cumulus, o que poderia ajudar os oócitos que retomaram a meiose a completarem o seu desenvolvimento até MII (HOSSEIN *et al.*, 2007b). Entretanto, segundo Pires (2006), a adição de CIS e cisteamina isoladas ou associadas não exerceu influência positiva sobre a maturação oocitária canina *in vitro*, mesmo os animais estando em fase folicular do ciclo estral.

O objetivo dessa dissertação foi determinar as taxas de maturação nuclear de oócitos mantidos em meio TCM-199 suplementado com os antioxidantes CIS ou  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Maturação *in vivo* e *in vitro*

Na maioria das espécies mamíferas, a maturação nuclear dos oócitos está automaticamente programada para ocorrer logo após a expulsão do oócito do folículo (SIRARD, 2001). Entretanto, a espécie canina é bem conhecida pelo seu modelo particular de maturação, ovulando oócitos imaturos em estágio de prófase da primeira divisão meiótica. A ovulação ocorre no início do estro, 24 a 48 horas após o estabelecimento do pico do hormônio luteinizante (LH), mas a luteinização folicular inicia antes deste momento, provocado pela influência das concentrações de progesterona (CONCANNON *et al.*, 1989; TSUTSUI, 1989). Isto difere substancialmente dos demais mamíferos domésticos, nos quais durante o desenvolvimento dos folículos pré-ovulatórios há predomínio de ação do estradiol (FARSTAD, 2000). A maturação nuclear oocitária, conseqüentemente, só é finalizada 48 a 72 horas depois da ovulação, na porção distal do oviduto, quando então os oócitos atingem o estágio de MII (CONCANNON *et al.*, 1989; TSUTSUI, 1989). Estima-se que a população ovariana de folículos pré-antrais na cadela seja em média de  $48541 \pm 18366$ , sendo 93% constituída de folículos primordiais, 4,9% de folículos primários e 0,8% de folículos secundários (MARINHO *et al.*, 2007).

Segundo Reynaud *et al.* (2005), o melhor método para a real visualização da ovulação na espécie canina, a qual parece ser o ponto de referência para a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário, é a ultrassonografia ovariana. Esta técnica, segundo os autores, por ser menos invasiva, reduziria o estresse, que poderia prejudicar o pico de LH e a ovulação. Assim, através dessa técnica, 56 oócitos originados de 13 cadelas foram analisados entre 17 e 48 horas após a ovulação. Os oócitos permaneceram em VG até 44 horas, alcançando MI entre 44 e 48 horas e a primeira MII visualizada em 54 horas. Todos os oócitos coletados nesse experimento apresentavam duas ou três camadas densas e compactas de células da granulosa, sem nenhuma mucificação. Entretanto, em folículos pré-ovulatórios, após o pico de LH, ocorre mucificação nas camadas periféricas da granulosa, circundando as três camadas internas mais densas. Assim, a persistência das comunicações íntimas entre o oócito e a corona radiata após o pico de LH, poderia contribuir para o atraso da ovulação e da retomada da meiose na cadela.



Muitas alterações ultra-estruturais do desenvolvimento oocitário canino são comuns aos dos demais oócitos mamíferos (TESORIERO, 1981), porém com algumas peculiaridades. O oócito canino pode ser distinguido pela presença de grandes quantidades de vesículas lipídicas, o que lhe confere a aparência escura e homogênea (GURAYA, 1965). A síntese destas vesículas lipídicas ocorre no oócito canino durante o crescimento folicular e indica um dos primeiros sinais de maturação oocitária (TESORIERO, 1981). Ainda, no momento da ovulação, as células do *cumulus oophorus* são compactas e compostas por diversas camadas. Durante a maturação oocitária, ocorre a expansão das células do *cumulus oophorus*, porém a camada mais interna permanece aderida ao zigoto até o estágio de mórula (RENTON *et al.*, 1991). Derussi *et al.* (2007) observaram que a zona pelúcida (ZP) de embriões caninos pode se apresentar com dois estratos de substâncias acelulares, sendo a parte interna formada por glicoproteínas e a externa constituída provavelmente por proteínas neutras. A aparente estrutura bi-laminar da ZP de embriões caninos observada neste experimento, segundo os autores, poderia estar relacionada à adição de componentes durante o trânsito no oviduto. Além disso, De Los Reyes *et al.* (2008) observaram que durante a MIV, a ZP de oócitos caninos sofre mudanças estruturais que poderiam influenciar a aproximação e penetração espermática durante a interação dos gametas. Entretanto, mesmo apresentando particularidades nos eventos de maturação oocitária, Saint-Dizier *et al.* (2004) procurando caracterizar a maturação oocitária das cadelas, acompanharam as modificações ocorridas na cromatina e nos microtúbulos e quantificaram a atividade do fator promotor da maturação (MPF) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAP quinase). Os autores concluíram que o citoesqueleto, a organização da cromatina e a atividade das quinases são semelhantes aos eventos observados nos oócitos dos demais mamíferos domésticos.

A aquisição de competência é um processo coordenado que inclui mudanças morfológicas, ultra-estruturais e de transcrição nos compartimentos nuclear e citoplasmático do oócito. Esses processos fisiológicos permitem a fecundação monospermica e o desenvolvimento dos embriões (LUVONI *et al.*, 2005). Holst e Phemister (1971) já demonstraram que oócitos de canídeos adquirem competência meiótica nos ambientes intra e extra folicular, mas os mecanismos que regulam a maturação nuclear e citoplasmática não estão completamente elucidados. Como os oócitos caninos são expostos às secreções do oviduto e ficam em contato com a mucosa por um tempo prolongado, essas questões podem ser cruciais na aquisição de

competência meiótica (LUVONI *et al.*, 2005). A morfologia oocitária inicial dos complexos *cumuli oophorus* (COCs) é um parâmetro importante para o processo de MIV e tem sido apontado como um prognóstico da competência meiótica. Nos caninos, a viabilidade das células do *cumulus* tem relação íntima com a progressão da meiose dos oócitos imaturos e com o aumento do tempo de CIV, estando a morfologia nuclear do oócito associada com as características de viabilidade apresentada pelas células do *cumulus* (RODRIGUEZ *et al.*, 2008).

Segundo Sirard (2001), a maturação oocitária *in vivo* pode ser dividida em três aspectos funcionais: (1) maturação nuclear, a qual reflete modificação da cromatina do estágio de vesícula germinal (VG) até MII; (2) maturação citoplasmática, que inclui todas as transformações na distribuição e na organização das organelas individuais da fase de vesícula germinal (VG) até MII e (3) maturação molecular, que é o legado de instruções acumuladas durante o estágio de VG, a qual envolve o acúmulo de mRNA específico e que controla tanto a maturação nuclear quanto citoplasmática até o período de transição do controle do desenvolvimento genoma materno para o do zigoto (TMZ).

A retomada da meiose induz à parada da transcrição e imediatamente limita a programação molecular requerida para a TMZ. Esse dado evidencia que os eventos que levam a modificações na programação molecular dos oócitos devem ocorrer antes da retomada da meiose, com o rompimento da vesícula germinal (SIRARD, 2001).

De acordo com Eppig *et al.* (1994), a maturação citoplasmática refere-se ao processo que prepara o oócito para uma adequada ativação e fecundação, formação dos pronúcleos e para o desenvolvimento embrionário até a implantação. A maturação citoplasmática pode ser avaliada pela observação do número e da localização dos grânulos corticais, através da cinética dos índices de maturação meiótica, formação da áster espermática após a fecundação, e através da sincronia na formação dos pronúcleos além do teor de glutatona no oócito (IZADYAR *et al.*, 1996)

Durante a meiose do oócito, os grânulos corticais são translocados para a periferia da célula e se fixam na parte citoplasmática da membrana plasmática, onde permanecem até o momento da fecundação, sendo esse pré-requisito para exocitose (WESSEL *et al.*, 2001). Eles desempenham importante papel no bloqueio da polispermia em oócitos mamíferos, pois modificam a ZP de maneira a formar uma barreira bioquímica e mecânica, evitando a penetração de mais de um espermatozóide durante o processo de fecundação (WANG *et al.*, 1997; WESSEL *et al.*, 2001).

Recentemente, De Los Reyes *et al.* (2007) avaliaram a distribuição dos grânulos corticais de oócitos caninos antes da maturação e depois de 96 horas de cultivo utilizando uma solução de *Lens culinaris* aglutinina (lecitina) conjugada ao isocianato de fluoresceína (FITC-LCA). Ao microscópio de epifluorescência, a intensidade da ligação da lecitina aos grânulos corticais foi uniforme nos oócitos imaturos quando comparado aos oócitos maturados *in vitro*. Observou-se uma significativa diferença na distribuição e intensidade de coloração dos grânulos corticais entre os oócitos antes do cultivo e 96 horas depois, indicando que o esclarecimento das mudanças que ocorrem na distribuição dos grânulos corticais durante o cultivo é importante para o entendimento do processo de maturação citoplasmática. Entretanto, segundo os autores, experimentos adicionais são necessários para determinar as exatas funções e características dos grânulos corticais na espécie canina, a fim de proporcionar que um maior número de oócitos caninos submetidos à MIV permaneça viável e criando condições para uma maior eficiência da FIV nessa espécie.

O completo desenvolvimento de apenas um dos componentes do complexo *cumulus*-oócito não necessariamente indica a maturação adequada ou total dos outros componentes. Assim, nem a expansão das células do *cumulus*, nem a progressão do material nuclear até o estágio de MII são indicativos úteis na avaliação da maturação citoplasmática, que por sua vez é essencial para que ocorra a fecundação e o desenvolvimento embrionário (BYERS *et al.*, 1992).

Na década de 70, Mahi e Yanagimachi (1976) realizaram os primeiros experimentos de maturação e penetração espermática *in vitro* de ovócitos caninos, com o objetivo de obter dados referentes aos eventos envolvidos na maturação e fecundação *in vitro* nessa espécie. Desde então, vários pesquisadores têm direcionado seus estudos aos eventos da fisiologia reprodutiva canina, com o objetivo de estabelecer condições de CIV apropriadas para maturação de oócitos caninos (YAMADA *et al.*, 1993; BOLAMBA *et al.*, 1998; HEWITT e ENGLAND, 1998; HEWITT e ENGLAND, 1999b; OTOI *et al.*, 2000; SONGSASEN *et al.*, 2002; BOGLIOLO *et al.*, 2002; LUVONI *et al.*, 2003; RODRIGUES e RODRIGUES, 2003a; WILLINGHAM-ROCKY *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2005; VANNUCCHI *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2007a). Mas apesar do esforço exercido por estes pesquisadores, os oócitos caninos apresentam taxas de maturação nuclear que ficam em torno de 20 %, e ainda não foi alcançado sucesso na rotina de produção embrionária (FARSTAD, 2000; LUVONI, 2000; SANTOS *et al.*, 2006; HOSSEIN *et al.*, 2007b).

Segundo Reynaud *et al.* (2005) o conhecimento preciso do processo de maturação de oócitos caninos, principalmente no que se refere aos fatores responsáveis pelo atraso na retomada da meiose precisam ser elucidados para possibilitar a melhora da eficiência das biotecnologias aplicadas nessa espécie. Ainda, as diferenças da fisiologia reprodutiva do cão comparada às outras espécies e a falta de informações precisas sobre o ambiente do oviduto, fazem com que sistemas *in vitro* destinados para outras espécies sejam inadequados para os oócitos caninos (LUVONI, 2000).

Diversos fatores biofísicos e bioquímicos podem interferir no êxito da maturação oocitária *in vitro* canina, tais como o meio, o sistema e tempo de cultivo, a tensão de oxigênio, as suplementações protéicas, os fatores de crescimento, os substratos energéticos e os antioxidantes (LUVONI *et al.*, 2005). A tensão de oxigênio influencia significativamente a maturação nuclear de oócitos murinos e bovinos, e alguns estudos sugerem que a tensão de 5% de oxigênio é preferível à tensão normal de 20% em ar (NASR-ESFAHANI *et al.*, 1992; SONGSASEN *et al.*, 2001; VAN SOOM *et al.*, 2002). O sistema de CIV resulta em concentrações de oxigênio mais elevadas que sistemas *in vivo*, o que leva ao aumento dos níveis de espécies oxigênio reativas (ROS) (LUVONI *et al.*, 1996), ocorrência de estresse oxidativo, peroxidação lipídica das membranas celulares e apoptose (DALVIT *et al.*, 2005). Apesar das vantagens implicadas com a redução da tensão de oxigênio durante o período de MIV, não existe evidência de que esta medida exerça algum efeito significativo na maturação de oócitos caninos (SONGSASEN *et al.*, 2001; SONGSASEN *et al.*, 2002).

Uma ferramenta comumente utilizada para minimizar os efeitos do estresse oxidativo durante a maturação *in vitro* é a utilização de antioxidantes, tais como a cisteína, o  $\beta$ -mercaptoetanol, o ácido ascórbico, o  $\alpha$ -tocoferol, a água de coco e a enzima superóxido dismutase (SOD) (ALI *et al.*, 2003; KITAGAWA *et al.*, 2004; TAO *et al.*, 2004; DALVIT *et al.*, 2005; MARTINS *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2007b). Todavia, o emprego de antioxidantes no meio de maturação de oócitos caninos tem sido pouco estudado.

## **2.2 O estresse oxidativo e as substâncias antioxidantes**

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre as ROS e as substâncias antioxidantes, podendo ser uma das causas do insucesso da MIV de oócitos e produção de embriões de várias espécies (AGARWAL *et al.*, 2005; LUBERDA, 2005;

RAUSSEL e TARIN, 2005).

Mesmo em condições basais, o metabolismo aeróbico está vinculado à produção de ROS (GUÉRIN *et al.*, 2001). As ROS servem como moléculas sinalizadoras em processos fisiológicos, especialmente na regeneração tecidual, sinalização hormonal, esteroidogênese e função celular embrionária, mas também possuem papel importante em processos patológicos envolvendo o trato reprodutivo feminino, modificando as funções celulares normais, comprometendo a sobrevivência da célula, ou ambos, quando a concentração crítica de ROS é ultrapassada (AGARWAL *et al.*, 2005; DROGE, 2002).

As ROS podem ser originárias tanto do metabolismo interno, a partir das rotas metabólicas e enzimáticas incluindo a fosforilação oxidativa, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), a oxidase e a xantina oxidase; quanto externo ao oócito e embrião, devido à presença de vários fatores no meio, tais como a concentração de oxigênio, cátions metálicos (Fe e Cu), luz, presença do espermatozóide e da enzima amino-oxidase (GUÉRIN *et al.*, 2001). Traços de cátions metálicos normalmente estão presentes na água e/ou nos produtos químicos utilizados para a preparação do meio de cultura e podem ter efeitos deletérios no desenvolvimento embrionário (NASR-ESFAHANI *et al.*, 1990a). As ROS são instáveis e altamente reativas, tornando-se estáveis pela aquisição de elétrons de ácidos nucleicos, lipídeos, proteínas, carboidratos, ou qualquer molécula próxima, causando uma cascata de reações em cadeia que resulta em dano celular, peroxidação lipídica, alterações mitocondriais, bloqueio no desenvolvimento embrionário, depleção de adenosina trifosfato (ATP), apoptose celular e patologias, como a endometriose (AGARWAL *et al.*, 2008; DALVIT *et al.*, 2005; GUÉRIN *et al.*, 2001).

Em camundongos, o aumento de ROS observado no cultivo de embriões *in vitro* coincide com o período no qual ocorre o bloqueio de desenvolvimento e é dependente do oócito. Particularmente, o bloqueio do estágio de duas células nesta espécie está associado com o aumento da peroxidação dos lipídios (NASR-ESFAHANI *et al.*, 1990b, NASR-ESFAHANI e JOHNSON, 1991). As ROS podem induzir à oxidação de proteínas e formação de dissulfidos, e como consequência à inativação de enzimas como a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989). Além disso, o estresse oxidativo induzido durante a MIV de oócitos de camundongos na presença da diamida (um agente tiol oxidante) conduz tanto à parada da meiose em estágio de metáfase I, quanto ao atraso da meiose naqueles

oócitos que progrediram até o estágio de MII (TARIN *et al.*, 1998b). Nos ratos, as ROS podem causar atresia dos folículos ovarianos e apoptose das células da granulosa (TILLY e TILLY, 1995).

As três maiores ROS incluem: o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), formado quando elétrons se desprendem da cadeia de transporte; o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) resultante da dismutação do superóxido ou diretamente da ação das enzimas oxidases; e o radical hidroxil ( $OH^-$ ), uma espécie altamente reativa que pode modificar as purinas e pirimidinas, causar fragmentação da fita de DNA e danificar o mesmo (AGARWAL *et al.*, 2008). Em adição ao  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^-$ , o radical hidroperóxido ( $HO_2$ ) possui papel chave no início da reação em cadeia da peroxidação lipídica nas membranas (BIELSKI *et al.*, 1983; ALVAREZ e STOREY, 1995).

Guérin *et al.* (2001) citam três principais características da produção de ROS pelos oócitos e embriões: 1) presença das três principais ROS,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  e  $OH^-$ ; 2) o nível de produção é particularmente importante durante o CIV e 3) a quantidade de ROS produzida varia de acordo com o estágio de desenvolvimento. Nos camundongos, por exemplo, um aumento na produção de ROS ocorre em duas ocasiões: no momento da fecundação e na transição da fase M do segundo ciclo celular, quando ocorre ativação da transcrição do genoma embrionário (NASR-ESFAHANI e JOHNSON, 1991).

Como as células estão constantemente submetidas ao estresse oxidativo exercido por uma grande variedade de agentes químicos, físicos e biológicos, vários sistemas antioxidantes nas células são capazes de controlar ou prevenir os efeitos adversos do oxigênio e seus intermediários reativos *in vivo* (CHOW, 2004).

De acordo com Halliwell e Gutteridge (1989), os antioxidantes são definidos como substâncias capazes de, em concentrações relativamente baixas, competirem com outros substratos oxidáveis e, deste modo, atrasar significativamente ou inibir a oxidação desses substratos. Ainda, para ser um antioxidante fisiologicamente efetivo, a substância precisa ter algumas propriedades biológicas e químicas: deve estar presente em certa quantidade no organismo; deve reagir com vários radicais livres; deve ser capaz de compartimentalização; deve estar disponível rapidamente; deve ser capaz de regeneração; deve ser conservado durante a filtração da urina e deve possuir níveis de toxicidade toleráveis (ROSE e BODE, 1993).

De acordo com Chow (1991), os mecanismos antioxidantes da célula incluem: (1) interação direta do ácido ascórbico, glutatona (GSH) e outros agentes redutores com oxidantes ou agentes oxidáveis; (2) retirada dos radicais livres e do oxigênio livre pela

vitamina E, ácido ascórbico, carotenóides, superóxido dismutase e outros; (3) redução dos peróxidos de hidrogênio pelas glutatona peroxidases e catalase; (4) ligação ou remoção de metais de transição pela ferritina, transferrina, ceruplasmina, albumina e outros quelantes; (5) separação ou prevenção das ROS de alcançarem o específico sítio de ação ou reagindo com componentes celulares essenciais pelas barreiras de membrana, e (6) reparação do dano causado por nutrientes dietéticos e atividades metabólicas.

Droge (2002) ainda relata que existem compostos com relativa baixa atividade antioxidante, mas que quando presentes em altas concentrações podem contribuir significativamente com a neutralização das ROS, tais como os aminoácidos livres (CIS), peptídeos e proteínas. Em algumas células, a exposição temporária a concentrações elevadas de ROS leva ao estímulo do sistema de transporte de cistina, o qual facilita o aumento da glutatona intracelular ou na expressão de genes dos quais os produtos exibem atividade antioxidante.

*In vivo*, os oócitos e embriões estão protegidos contra o estresse oxidativo pela presença de neutralizadores do oxigênio no fluido folicular (FF) e do oviduto (GUÉRIN *et al.*, 2001), fornecendo um importante microambiente para o adequado desenvolvimento dos oócitos (BAKA e MALAMITSI-PUCHNER, 2006). A presença da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) e outras isoenzimas têm sido relatadas no FF humano (OYAWOYE *et al.*, 2003). Considerando a atividade antioxidante do FF, Oyawoye *et al.* (2003) demonstraram que a média da capacidade total antioxidante (CTA) no fluido de folículos contendo oócitos não diferiu dos folículos vazios. Os oócitos fecundados tiveram CTA significativamente maior nos seus FFs do que aqueles que não foram fecundados, demonstrando que baixos níveis de CTA predizem o decréscimo do potencial de fecundação. Tatemoto *et al.* (2004) tentaram esclarecer onde o FF poderia exercer um efeito protetor quando adicionado ao meio de cultivo durante a maturação de oócitos suínos, presumivelmente pela atividade endógena da enzima superóxido dismutase (SOD), sugerindo que durante a maturação folicular, isoenzimas da SOD são secretadas no FF. Esse experimento demonstrou que a alta atividade da SOD no FF bloqueou eficientemente a diminuição da concentração intracelular de GSH e o dano ao DNA causado pelo estresse oxidativo nos oócitos suínos e nas células do *cumulus*, resultando em manutenção da habilidade em formar o pronúcleo masculino e em manter o desenvolvimento até o estágio de blastocisto. Além disso, vários outros fatores tais como, o sistema ligante Fas-Fas, o óxido nítrico (NO), o

fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), o ácido hialurônico e as gelatinases presentes no FF exercem um papel importante no desenvolvimento oocitário durante a FIV (BAKA e MALAMITSI-PUCHNER, 2006).

Durante o CIV os oócitos são expostos constantemente ao estresse oxidativo, uma vez que a coleta envolve exposição à luz, concentrações elevadas de oxigênio e mudanças nas concentrações de substratos (GUÉRIN *et al.*, 2001; LUVONI *et al.*, 1996). Jeong *et al.* (2006) citam a suplementação do meio de cultivo com antioxidantes como uma importante maneira de minimizar o estresse oxidativo. Tarin *et al.* (1998b) observaram que a terapia antioxidante suprime os efeitos perturbadores da diamida e previne os efeitos do envelhecimento materno da divisão meiótica e segregação dos cromossomos nos oócitos de camundongos, diminuindo a porcentagem de aneuploidia e diploidia.

Entretanto, o papel das ROS e dos radicais livres na reprodução ainda é desconhecido. Em humanos, por exemplo, eles exercem diversas funções em segmentos diferentes do trato reprodutivo feminino e no desenvolvimento embrionário (BAKA e MALAMITSI-PUCHNER, 2006). Vários compostos não enzimáticos possuem funções antioxidantes, incluindo as vitaminas A, C e E, o piruvato, e os compostos sulfurados tais como a glutathione (GSH), a hipotaurina, a taurina e a cisteamina (GUÉRIN *et al.*, 2001).

### 2.2.1 Os compostos Tiois

A glutathione ( $\gamma$ -glutamyl-CIS-glicina) (GSH) é o maior composto tiol sulfidril não-protéico nas células mamíferas o qual possui funções biológicas importantes durante a proliferação celular, transporte de aminoácidos, síntese de proteína e DNA, e redução de dissulfidos e outras substâncias químicas, protegendo as células contra os danos oxidativos (MEISTER e TATE, 1976; MEISTER e ANDERSON, 1983; LUBERDA, 2005; RAUSSEL e TARIN, 2005).

Os compostos tiois funcionam como reservas naturais da capacidade redutora da célula e, portanto são considerados como o maior provedor da habilidade oocitária em descondensar a cromatina presente na cabeça do espermatozóide durante a fecundação e de defesa principalmente contra o efeito citotóxico do peróxido de hidrogênio (MEISTER, 1983). Nos estágios iniciais de maturação, o fornecimento de GSH é dependente do transporte efetuado através da membrana plasmática. Mas por outro lado,



Meister e Tate (1976) demonstraram que a habilidade celular para o transporte de GSH depende do ciclo  $\gamma$ -glutamil e da disponibilidade dos aminoácidos precursores, tais como a cisteína (CIS), e outros compostos como a cistina, cisteamina e o  $\beta$ -mercaptoetanol (BME).

Na espécie bovina, a adição no meio de cultivo de cistina, CIS, N-acetil-CIS e cisteamina são responsáveis pelo aumento na síntese de GSH intracelular (DE MATOS *et al.*, 1997). Neste experimento, a cistina estimulou a produção de GSH apenas quando células do *cumulus* estavam presentes nos oócitos, indicando que essas representam um papel importante na produção de GSH celular. Mas, com a adição de CIS ou cisteamina ao meio de MIV, a síntese de GSH também foi observada em oócitos desprovidos de células do cumulus ou na presença de uma única camada de células do *cumulus*. Mais tarde, De Matos e Furnus (2000) testaram o efeito da adição do BME, da CIS e da cistina no meio de MIV no desenvolvimento embrionário bovino. A adição desses compostos ao meio de MIV estimulou a taxa de desenvolvimento embrionário bovino até o estágio de blastocisto e os altos níveis de GSH promovidos por esses compostos foram mantidos depois da FIV. Assim, segundo os autores, o efeito benéfico exercido pela síntese de GSH durante a MIV pode ter facilitado o processo de fecundação e também o desenvolvimento embrionário, uma vez que a GSH é um importante fator citoplasmático para a penetração do espermatozóide no oócito, descondensação da cromatina espermática e conseqüente formação do pronúcleo masculino.

Entretanto, Van Soom *et al.* (2002) avaliando a prevalência da apoptose celular durante o desenvolvimento embrionário bovino e o efeito da presença ou ausência da L-CIS em fluido sintético de oviduto modificado (mSOF) nos embriões cultivados em duas tensões de oxigênio (5% e 20% O<sub>2</sub>), não puderam considerar a presença de CIS como um facilitador para a elevação da qualidade embrionária. Apesar dos embriões cultivados na presença de CIS apresentarem um maior número de células do botão embrionário, inesperadamente a adição de 0,6mM de CIS ao meio de cultivo causou um aumento significativo na proporção de células em apoptose, mesmo em embriões cultivados em tensão de 5% de oxigênio.

Posteriormente, Ali *et al.* (2003) realizaram experimentos na espécie bovina para determinar os efeitos dos antioxidantes CIS, N-acetil-L-CIS (NAC), catalase e da SOD no desenvolvimento de oócitos até o estágio de mórula e blastocisto quando adicionados na MIV, FIV e durante as primeiras 72 horas da CIV. Os oócitos foram maturados e fecundados sob tensão de 20% de oxigênio, em um meio definido com

baixa concentração de glicose. Os resultados mostraram que, a CIS (0,6mM) quando adicionada ao meio de MIV melhorou as taxas de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, fato não observado com os antioxidantes NAC, catalase e SOD. Entretanto, a adição dos antioxidantes em baixas concentrações no meio de FIV não afetou as porcentagens de embriões produzidos e altas concentrações reduziram significativamente as porcentagens de mórulas e blastocistos, demonstrando que os radicais livres talvez exerçam um papel fisiológico durante a FIV. A adição de CIS ao meio de cultivo embrionário também estimulou o desenvolvimento dos embriões bovinos. A captação da CIS pelas células embrionárias levaria à diminuição de ROS, conseqüentemente à diminuição do peróxido de oxigênio e melhor desenvolvimento embrionário. Apesar das similaridades entre a NAC e a CIS, a primeira não estimulou o desenvolvimento embrionário. Segundo os autores, os efeitos benéficos da NAC através das suas propriedades antioxidantes poderiam ter sido neutralizados pelos efeitos inibitórios no fator de transcrição nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B), o qual tem sido demonstrado ser essencial para o desenvolvimento de embriões de camundongos dos estádios de 1 a 4 células.

Oyamada e Fukui (2004) testaram os efeitos da adição da cisteamina, do fator de crescimento epidérmico (EGF) e da glicose como substrato de energia em baixas tensões de oxigênio durante a MIV de oócitos bovinos. O EGF e/ou cisteamina não mostrou ser positiva na maturação nuclear dos oócitos, mas melhorou a taxa de fecundação diminuindo a incidência de polispermia, e melhorando a crioresistência após a vitrificação dos embriões, provavelmente devido à síntese aumentada de GSH durante a MIV. Segundo os autores, quando a cisteamina é adicionada ao meio de maturação, o nível intracelular de GSH é mantido alto até o início do cultivo, resultando em estímulo ao desenvolvimento embrionário. Além disso, eles concluíram que baixas tensões de oxigênio durante a MIV tem efeito estimulatório na síntese de GSH, aumentando a crioresistência dos blastocistos durante a vitrificação.

Balasubramanian e Rho (2007) cultivaram oócitos bovinos na presença de cisteamina e não observaram significativo efeito na maturação oocitária nem na fecundação, mas as proporções de oócitos que após a fecundação desenvolveram até o estágio de blastocisto aumentaram, assim como a resistência ao congelamento confirmando os resultados obtidos por Oyamada e Fukui (2004).

Na espécie suína, Yoshida *et al.* (1993) examinaram a concentração de GSH durante a maturação e depois da fecundação de oócitos suínos na presença de CIS

(0,04mM a 0,57mM) em diferentes meios de maturação. As taxas de formação do pronúcleo masculino foram significativamente maiores nos oócitos maturados em meio suplementado com 0,04mM de CIS e o efeito estimulatório máximo da síntese de GSH foi obtido com a adição de 0,57mM. Os resultados desse estudo também demonstraram que, nessa espécie, a composição do meio afeta a concentração de GSH dos oócitos, sendo maior em oócitos maturados em meio Waymouth (o qual contém 0,06mM de cistina e 0,57mM de CIS) do que em TCM-199 modificado. A concentração de GSH foi significativamente maior depois de 12 horas de cultivo no meio suplementado com CIS, em comparação à concentração antes do cultivo, mostrando que as concentrações de GSH se alteram durante a maturação. Além disso, os oócitos maturados *in vivo* apresentaram maiores concentrações de GSH do que aqueles maturados *in vitro* e suplementados com 0,04mM ou 0,08mM de CIS.

Posteriormente, Sawai *et al.* (1997) observaram que a adição de 0,57mM de CIS ao meio de maturação, nos tempos 0, 12, 24 e 36 horas de cultivo, aumentou a concentração de GSH e a incidência de formação do pronúcleo masculino em suínos. Entretanto, a presença de CIS no meio de maturação foi crucial entre as 42 e 48 horas de cultivo, quando os oócitos estavam no estágio final de desenvolvimento de MI para MII. A concentração de 0,57mM de CIS também foi testada por Ka *et al.* (1997) na FIV de oócitos suínos. Esta foi responsável pelo estímulo da formação do pronúcleo masculino, acontecendo o mesmo na presença das células do *cumulus*. A eficácia das células do *cumulus* em promover a formação do pronúcleo masculino foi maior quando os oócitos foram cultivados na presença de aminoácidos ou CIS, demonstrando a transferência dos aminoácidos para os oócitos através das junções comunicantes entre o oócito e as células do *cumulus*.

Abeydeera *et al.* (1998) avaliaram o efeito da adição do BME (um precursor da CIS) durante a MIV de oócitos suínos na FIV, concentração de GSH intracelular e desenvolvimento embrionário. A presença ou ausência do BME não revelou diferenças estatísticas nas taxas de penetração (69 a 81%), polispermia (31 a 45%) e formação do pronúcleo masculino (97 a 99%). Entretanto, comparado ao controle (26%), a presença de 12,5 ou 25 $\mu$ M de BME durante a MIV aumentou significativamente a taxa de formação de blastocistos (34 ou 41%, respectivamente). Além disso, os blastocistos expandidos oriundos de oócitos maturados na presença de 25 $\mu$ M de BME apresentaram maior número de células do trofoectoderma (TE) e número total de células, diferença atribuída à concentração de GSH intracelular. Este fato não foi observado nos oócitos

expostos à concentração de 50 $\mu$ M de BME, sugerindo que altas concentrações de BME sejam prejudiciais à cinética normal da maturação oocitária.

Mais tarde, Yamauchi e Nagai (1999) compararam a maturação de oócitos desnudos (DOs) e COCs na ausência ou presença de 5, 50 e 150 $\mu$ M de cisteamina na MIV suína. As taxas de maturação dos oócitos desnudos (DOs) (60-70%) cultivados com ou sem cisteamina não foram estatisticamente diferentes entre si, mas foram significativamente menores do que aquelas observadas nos COCs (90-100%). Na presença de cisteamina, as concentrações de GSH aumentaram significativamente nos COCs, mas permaneceram constantes nos DOs e, na sua ausência a quantidade de GSH nos oócitos diminuiu significativamente. Para os DOs, a adição de 150 $\mu$ M de cisteamina no meio de cultivo estimulou a formação do pronúcleo masculino na mesma percentagem observada nos COCs cultivados com a mesma concentração. Os resultados indicaram que os oócitos suínos continuam a maturação nuclear *in vitro* até MII sem o suporte das células do *cumulus*, mas com menor eficiência e que as células do *cumulus oophorus* não são sempre necessárias para a formação do pronúcleo masculino. Mas, de acordo com os autores, a baixa eficiência observada no cultivo na ausência das células do *cumulus oophorus* pode ser controlada pelas condições de cultivo *in vitro* através, por exemplo, da adição de cisteamina ao meio.

Por outro lado, Tatemoto *et al.* (2000) concluíram que a presença das células do *cumulus oophorus* exercem papel fundamental na proteção dos oócitos contra a apoptose celular pelo aumento das concentrações de GSH nos mesmos. Para avaliar o efeito protetor das células do *cumulus oophorus* no dano celular causado pelos radicais livres, COCs e DOs foram cultivados na presença ou ausência da hipoxantina-xantina oxidase (XOD). Os resultados mostraram que a taxa de maturação dos COCs até o estágio de MII diminuiu significativamente (69%) na presença da XOD quando comparados ao meio controle (86%) e o efeito inibitório da XOD na maturação nuclear foi mais evidente no cultivo dos DOs. Nos DOs, a retomada da meiose foi bloqueada e a incidência de oócitos degenerados aumentou significativamente. Ainda, os DOs suínos cultivados na presença da XOD tornaram-se suscetíveis ao estresse oxidativo, evidenciado pela alta incidência de degeneração, fragmentação do DNA e a ativação da caspase-3. Entretanto, nos COCs expostos aos radicais livres, apenas a taxa de maturação nuclear diminuiu, não sendo observado nenhum outro efeito deletério. Segundo os autores, as diferentes respostas entre COCs e DOs ao estresse oxidativo, podem estar associadas às diferentes habilidades de sintetizar GSH durante a MIV,

particularmente pela presença das células do *cumulus oophorus*.

Bing *et al.* (2001) realizaram o primeiro experimento demonstrando que a presença de cisteamina aumenta significativamente as taxas de oócitos suínos que progrediram de VGBD e maturaram até o estágio de MII quando cultivados em um meio acrescido de estrógeno e baixas concentrações de FSH ou na ausência de FSH. Os autores concluíram que as baixas concentrações de FSH (1µg/ml) não eram suficientes para induzir a completa maturação nuclear dos oócitos, mas isso poderia ser observado na presença de cisteamina e estrógeno. A cisteamina estaria envolvida no aumento das taxas de maturação oocitária pela neutralização dos radicais livres nos oócitos, resultando também no aumento das taxas de formação do pronúcleo masculino observado nesse experimento.

Wang e Day (2002) demonstraram pela primeira vez que oócitos suínos maturados e fecundados *in vitro* podem atingir o estágio de blastocisto em um meio quimicamente definido na presença de GSH. Segundo os autores, apesar da taxa de formação de blastocistos ter sido baixa, a vantagem de se utilizar esse sistema é de se avaliar os outros componentes do meio e possibilitar o desenvolvimento de um sistema de produção de embriões suíno mais adequado. Além disso, quando a GSH foi adicionada ao meio de cultivo na presença de albumina sérica bovina (BSA), a taxa de formação de blastocistos aumentou significativamente, evidenciando um efeito sinérgico entre a BSA e a GSH. Fatores de crescimento, hormônios, aminoácidos ou vitaminas, os quais estimulam a divisão celular, presentes no soro e na albumina sérica associados ao papel antioxidante da glutathione podem ter sido responsáveis pelos efeitos sinérgicos no desenvolvimento até o estágio de blastocisto.

Whitaker e Knight (2004) avaliaram na espécie suína os efeitos de vários compostos do ciclo  $\gamma$ -glutamil suplementados na MIV, FIV e CIV de oócitos suínos, incluindo L-CIS, L-cisteamina, L-CIS + L-cisteamina, L-glicina, L-glutamato, L- $\alpha$ -aminobutirato, BME, L-CIS + BME ou L- $\alpha$ -aminobutirato + BME. O meio de maturação utilizado foi o NCSU23 e os resultados demonstraram que os oócitos maturados com L-CIS, L-glutamato, L- $\alpha$ -aminobutirato e L- $\alpha$ -aminobutirato + BME apresentaram maiores concentrações de GSH. Os oócitos maturados com L- $\alpha$ -aminobutirato e BME revelaram menores taxas de polispermia durante a FIV e uma maior percentagem de embriões alcançando o estágio de blastocisto comparativamente aos outros tratamentos. Entretanto, nenhum dos tratamentos influenciou a taxa de morte celular embrionária, mas esta se mostrou ser maior aproximadamente 36 horas após a

FIV. Assim, os autores acreditam que qualquer modificação para se aumentar a viabilidade embrionária deve ser feita antes das 24 horas do desenvolvimento do embrião nessa espécie.

Kishida *et al.* (2004), observaram que a adição de CIS e do fator de crescimento epidérmico (EGF) em meio definido contendo 0,1% de álcool polivinílico e aminoácidos na MIV suína aumentou as taxas de maturação nuclear, clivagem e concentrações de GSH quando os resultados foram comparados ao meio definido sem suplementação. Os embriões derivados de oócitos maturados em meio definido contendo CIS e EGF desenvolveram-se até o estágio de blastocisto após a injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI), fato provavelmente relacionado ao aumento das concentrações intracelulares de GSH. Não houve diferença entre as taxas de clivagem, entre os meios indefinido (contendo soro de bezerro recém nascido) e definido (contendo CIS e EGF), e a taxa de desenvolvimento até blastocisto foi menor no meio definido comparativamente ao meio indefinido.

Song e Lee (2007) observaram que a adição de cisteamina ou do BME no meio de MIV de oócitos suínos não melhorou as taxas de maturação, quando comparado ao controle. As taxas de clivagem embrionária, formação de blastocisto e número de células em embriões desenvolvidos partenogeneticamente não foi influenciada pela presença desses antioxidantes durante a MIV, assim como naqueles embriões derivados de transferência nuclear de células somáticas. Segundo os autores, a capacidade de desenvolvimento de embriões derivados desse processo é menor que daqueles fecundados, e poderia existir em um intervalo demasiadamente baixo para ser melhorado pelos efeitos antioxidantes da cisteamina e do BME.

Linh *et al.* (2007) avaliaram a competência de oócitos suínos maturados na presença de CIS em diferentes concentrações (0, 0,05, 0,1, 0,2, e 0,6mM) expostos à baixa tensão de oxigênio (5%). Os resultados revelaram que a concentração de GSH nos oócitos submetidos à MIV em tensão baixa de oxigênio aumentou significativamente de acordo com o aumento da concentração de CIS. Entretanto, a presença de CIS, qualquer que fosse a concentração, não promoveu efeitos na maturação nuclear, fecundação, formação do pronúcleo masculino e subsequente desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto.

Nos bubalinos, Gasparrini *et al.* (2006) demonstraram que a adição de compostos tiois aumentou significativamente a reserva de GSH dos oócitos comparativamente àqueles maturados em meio não suplementado, observando níveis

similares nos meios suplementados com cisteamina ou cistina. Entretanto, o maior nível de GSH intracitoplasmático foi observado quando os oócitos foram maturados na presença simultânea dos dois antioxidantes. O efeito estimulante da cisteamina na síntese de GSH provavelmente estaria relacionado à sua habilidade de reduzir a cistina em CIS, que é a precursora final do ciclo  $\gamma$ -glutamil-CIS-sintetase. Apesar das taxas de maturação nuclear terem sido similares entre os grupos, a aparência morfológica dos oócitos e a expansão das células do *cumulus* após a MIV melhorou na presença de cistina. A cistina, na presença ou não de cisteamina resultou em maiores proporções de desenvolvimento síncrono do pronúcleo após a FIV, demonstrando o efeito positivo da cistina na fecundação *in vitro* nessa espécie. O aumento na formação do pronúcleo observado após a FIV refletiu nos aumentos das taxas de clivagem observadas no experimento.

Em caprinos pré-púberes, Mayor *et al.* (2001) não observaram incremento nas taxas de MII quando a GSH e a CIS foram adicionadas ao meio de maturação de oócitos. Os autores sugerem que a concentração intracelular de GSH dos oócitos nessa espécie, antes do início do processo de meiose, provavelmente seja suficiente para a efetiva maturação nuclear. Além disso, os requisitos fisiológicos de GSH intracelular podem ser perfeitamente cumpridos pela massa de células do *cumulus*. Apesar de ser considerado um fator limitante para a síntese de GSH, a CIS não é o único fator responsável pela síntese de GSH nos oócitos de caprinos, já que neste estudo, nenhum efeito benéfico foi observado nos parâmetros de fecundação quando o meio de maturação foi suplementado com CIS.

Chen *et al.* (2005) observaram que a presença de cisteamina durante a MIV de oócitos imaturos de camundongos aumentou significativamente a maturação nuclear até o estágio de MII, mesmo quando submetidos por um curto tempo em um ambiente seco e deficiente de CO<sub>2</sub>, representado por uma incubadora portátil utilizada para o transporte entre laboratórios. Entretanto, a cisteamina não estimulou a fecundação e as taxas de desenvolvimento embrionário quando a comparação era efetuada com oócitos maturados na ausência de cisteamina. Os autores sugerem que o estágio de desenvolvimento dos embriões e as diferenças espécies-específicas, além de diferenças nos protocolos de cultivo podem explicar os resultados obtidos. Ainda, alguns oócitos desprovidos de células do *cumulus* foram incluídos no experimento e estes alcançaram o estágio de MII durante a MIV e foram submetidos à FIV. De acordo com os autores, como as células dos *cumulus* são importantes na maturação oocitária e na síntese de

GSH na presença de cisteamina, isso explicaria porque a cisteamina não teria melhorado a competência meiótica desses óocitos desnudos submetidos à FIV.

Nos felinos domésticos, Luvoni *et al.* (2006) observaram que após 24 horas de cultivo, a presença de CIS, e as associações de CIS-cisteamina e CIS-BME podem evitar a depleção das concentrações de GSH nos óocitos submetidos à MIV. Além disso, quando os compostos tiois estão presentes, a concentração de GSH está intimamente associada à progressão nuclear oocitária, observando-se maiores concentrações nos óocitos em estágio de MII.

Até o presente momento poucos pesquisadores testaram os efeitos dos compostos tiois na maturação nuclear de óocitos caninos. Kim *et al.* (2004) foram os primeiros pesquisadores a avaliarem o efeito do BME em associação ao EGF na MIV de óocitos caninos obtidos de fêmeas em diferentes estágios do ciclo estral. Os óocitos foram submetidos a diferentes concentrações de BME (25, 50 e 100 $\mu$ M) e EGF (10 e 20ng/ml) por 72 horas. Uma percentagem significativamente maior de óocitos progrediram até MII quando suplementados com 50 ou 100 $\mu$ M (20 ou 13% respectivamente) na fase folicular, assim como a taxa de maturação até MI foi maior nos óocitos coletados da fase folicular e suplementados com 25 ou 100 $\mu$ M de BME (29 ou 32%, respectivamente). Óocitos provenientes da fase folicular e maturados com 20ng/mL de EGF exibiram taxas mais elevadas de maturação nuclear até MII se comparados aos outros grupos (13% versus 3% e 6%, respectivamente). Para esses autores, ambos, BME e EGF, estimularam a produção de GSH, mas apenas na fase folicular do ciclo estral.

Pires (2006), entretanto, não evidenciou qualquer efeito benéfico da utilização dos antioxidantes CIS e cisteamina na MIV de óocitos caninos provenientes da fase folicular do ciclo estral. Apesar das taxas de VGBD terem sido elevadas em todos os tratamentos (A): meio controle – 26%; (B): controle + 0,1 mM de CIS – 34%; (C): controle + 100 $\mu$ M de cisteamina – 27% e (D): controle + 0,1mM de CIS + 100 $\mu$ M de cisteamina – 19%, segundo o autor, estes índices poderiam ser explicados pela própria fase do ciclo estral, onde a onda pré-ovulatória de LH reduziria a comunicação existente entre as células do *cumulus* e o óocito, interrompendo o transporte de substâncias que inibem a competência meiótica e indiretamente promovendo a quebra da VG, além do aumento intra-oocitário do cálcio e aumento do AMPc, os quais também levam à quebra da VG. Além disso, o autor ressalta que a CIS utilizada como substrato para GSH é um aminoácido muito instável, sendo rapidamente oxidado em cistina. Desta forma,



concentração de 0,1 $\mu$ M de CIS adicionada ao meio, independentemente se isolada ou associada à cisteamina, pode não ter sido suficiente para manter a produção da glutathiona, em virtude do grande estresse sofrido durante o processo de maturação *in vitro*.

Mais recentemente, Kim *et al.* (2007) avaliaram as concentrações de GSH de oócitos maturados *in vivo* e *in vitro* na presença do BME. Nesse trabalho, os oócitos foram coletados de cadelas em diferentes fases do ciclo estral, divididos em 2 grupos de acordo com o diâmetro oocitário (<120 $\mu$ m e >120 $\mu$ m) e cultivados por 72 horas em TCM- 199. Os resultados indicaram que oócitos com diâmetro maior que 120 $\mu$ m, provenientes da fase folicular e luteal, tiveram teor de GSH médio significativamente maior (6,7 e 6,5 pM/oócito, respectivamente) quando comparados aos oócitos menores que 120 $\mu$ m de diâmetro (3,5 e 3,1 pM/oócito, respectivamente). A presença do BME aumentou a concentração média de GSH dos oócitos caninos, com diferenças estatisticamente significantes entre os oócitos provenientes do anestro e das fases folicular e luteal, respectivamente, na ausência ou presença do BME (4,1 e 5,7; 8,1 e 13,3 e 7,8 e 12,8 pM/oócito, respectivamente). Além disso, os oócitos maturados *in vivo* tiveram teor médio de GSH significativamente maior (19,2 pM/oócito). Esse trabalho revela que os oócitos imaturos podem sintetizar GSH durante a MIV e que a adição de BME ao meio de maturação aumenta a sua síntese. Entretanto, diferentes respostas à síntese de GSH foram observadas de acordo com a fase reprodutiva do ciclo, sendo os oócitos da fase folicular e luteal superiores aos do anestro.

Em seguida, Hossein *et al.* (2007b) avaliaram os efeitos da adição da CIS (0,1, 0,5 e 1mM) e da cisteamina (50, 100 e 200 $\mu$ M) na maturação citoplasmática e nuclear de oócitos caninos coletados em diferentes fases do ciclo estral. Segundo os autores, os efeitos da CIS e da cisteamina na MIV canina variam de acordo com a fase do ciclo estral das cadelas doadoras. Na fase folicular, significativamente mais oócitos alcançaram o estágio de MII quando cultivados com 0,5 ou 1mM de CIS (16,7% e 16,9%, respectivamente) se comparados ao meio controle (6,2%). Igualmente, a cisteamina, na fase folicular, aumentou a taxa de maturação até o estágio de MII (15,1% até 17%), quando esta era comparada ao controle (4,4%). Quando suplementadas concomitantemente, CIS (0,5mM) e cisteamina (100 $\mu$ M) ou separadas, ambas aumentaram os níveis de GSH intracelular, mas somente na fase folicular. Entretanto, dentro do mesmo estágio reprodutivo, não houve diferença estatística na retomada de meiose. Segundo os autores, apesar da CIS e da cisteamina não exercerem efeito na

retomada da meiose, elas promovem melhores condições de cultivo pelas suas propriedades antioxidantes ou influenciando positivamente a síntese de DNA nas células do *cumulus*, o que auxiliaria os oócitos que retomaram a meiose alcançarem o estágio de MII.

### 2.2.2 A Vitamina E

A vitamina E foi descoberta há mais de 80 anos (EVANS e BISHOP, 1922). Desde então, com o reconhecimento do papel dos radicais livres na patogênese das doenças degenerativas e a possível prevenção das mesmas pelos antioxidantes, o interesse na vitamina E foi renovado e expandido (CHOW, 2004).

A vitamina E foi reconhecida pela primeira vez como uma substância solúvel em lipídeos, necessária para a prevenção da morte e reabsorção fetal em ratos que haviam sido alimentados com uma dieta à base de gordura rançosa (EVANS e BISHOP, 1922). Mais tarde, Evans (1925) demonstrou que a infertilidade masculina em ratos poderia ser evitada a partir da adição à ração básica de alguns alimentos como folhas de leguminosas, leite, carne bovina e extrato de germe de trigo, ricos em uma substância a qual foi chamada de vitamina E. Evans e Burr (1925) observaram que ratos alimentados com várias misturas de alimentos sintéticos, consistindo em gordura, carboidratos e proteínas, separados e em forma relativamente pura, adicionados de uma apropriada mistura de sal e vitaminas A e B cresciam bem e possuíam aparência saudável. Mas, dependendo do caráter exato e das proporções dos constituintes da alimentação, eles exibiam cedo ou tarde infertilidade. Segundo eles, a infertilidade era uma deficiência dietética, que poderia ser contornada ou prevenida pela mudança na dieta, envolvendo a adição de alimentos ricos em vitamina E ou de pequenas porções dos extratos desses alimentos.

Atualmente, a vitamina E representa um termo genérico para todos os tocoferóis e seus derivados que possuem atividade biológica do RRR- $\alpha$ -tocoferol, compostos estereoisômeros com atividade de vitamina E. Sabe-se que existem na natureza oito substâncias com esse tipo de atividade:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, e  $\delta$ -tocoferol e  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, e  $\delta$ -tocotrienol, sendo estes últimos as formas primárias da vitamina E (SEN *et al.*, 2006).

A vitamina E funciona intimamente com outros sistemas antioxidantes (CHOW, 1979; CHOW, 1991). O ácido ascórbico, GSH, ácido lipóico, e o ubiquinol, por exemplo, estão envolvidos na regeneração ou restauração da vitamina E. A redução da

formação do peróxido de hidrogênio, a enzima seleno-GSH peroxidase e suas enzimas funcionalmente relacionadas, a GSH-dissulfido redutase e a glicose-6-fosfato desidrogenase, também aumentam a função da vitamina E contra o dano peroxidativo das membranas lipídicas (CHOW e TAPPEL, 1972; CHOW *et al.*, 1973). Dentre as GSH peroxidases, a fosfolípido hidroxiperóxido GSH peroxidase parece ser a mais efetiva na prevenção do dano oxidativo das membranas lipídicas, aumentando as funções antioxidantes da vitamina E (URSINI *et al.*, 1985; IMAI e NAKAGAWA, 2003).

Enquanto uma variedade de anormalidades bioquímicas é associada à deficiência de vitamina E, os mecanismos pelo qual a vitamina E previne várias lesões metabólicas e patológicas ainda não estão bem claros (CHOW, 2004). Chow *et al.* (1999) demonstraram que a suplementação dietética de vitamina E atenuou a produção de peróxido de hidrogênio mitocondrial isolado de fígado e musculatura esquelética de ratos. A vitamina E dietética reduziu também os níveis de superóxido pela estabilização das membranas mitocondriais, retirando-o do meio. A redução da produção dos níveis de superóxido pela vitamina E dietética não apenas atenuou o estresse oxidativo, mas também modulou a expressão e/ou ativação de modificadores biológicos redox-sensíveis vitais para os eventos celulares (CHOW, 2001). Além disso, a vitamina E dietética é reconhecida há algum tempo por alterar o metabolismo do ferro e proteger contra o dano oxidativo resultante da sobrecarga do mesmo (CHOU *et al.*, 1978; FRAGA e OTEIZA, 2002). Em camundongos, a administração de antioxidantes orais, incluindo vitamina E e C, diminuiu a formação oócitos com distribuição anormal dos cromossomos (aneuploidia ou diploidia) (TARIN *et al.*, 1998a). Também, combateu os efeitos negativos do envelhecimento na fêmea, tanto no número de oócitos quanto na porcentagem total de oócitos coletados do oviduto e ovários, e que exibiam uma distribuição normal de cromossomos na MII e/ou que apresentavam traços de apoptose (TARIN *et al.*, 2002a). Mais adiante, diminuiu a atividade da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e aumentou a probabilidade de alcançar o estágio de pronúcleo após a ativação partenogênica de oócitos (TARIN *et al.*, 2002b). Entretanto, Tarin *et al.* (2002c) observaram que a administração oral de doses farmacológicas de vitamina E e C poderiam reduzir a aptidão reprodutiva e diminuir as funções ovarianas e uterinas de camundongas, demonstrando a falta de consenso da real necessidade dessas vitaminas para a melhora do desempenho reprodutivo.

A vitamina E previne o dano oxidativo ou exerce a sua atividade antioxidante

através de dois mecanismos: (1) varredura direta dos radicais livres e (2) regulação da produção mitocondrial de superóxido, o qual conseqüentemente reduz a formação de peroxinitrito (resultante da interação entre os ânions superóxido e o óxido nítrico) e libera o ferro instável do seu complexo protéico. Reduzindo o superóxido e a disponibilidade do ferro, que é instável, a possibilidade de formação do radical hidroxil também é reduzida (CHOW, 2004). *In vitro*, acredita-se que a vitamina E seja o primeiro neutralizador de radicais livres das membranas celulares mamíferas (CHOW, 1991), protegendo os ácidos graxos poliinsaturados das membranas lipídicas, evitando danos estruturais, de função e de permeabilidade da membrana, que eventualmente levariam à injúria celular irreversível e morte (OLSON e SEIDEL, 2000).

Steele *et al.* (1974) realizaram um dos primeiros experimentos avaliando os efeitos da vitamina E suplementada ao meio de cultivo *in vitro* no desenvolvimento de embriões de ratos, observando aumento na taxa de sobrevivência dos mesmos. Aréchiga *et al.* (1994) observaram que a vitamina E aumentou a viabilidade de embriões de camundongos expostos a temperaturas elevadas, protegendo-os dos efeitos deletérios do choque pelo calor, apesar da taxa de desenvolvimento até blastocisto não ter sido afetada pela presença da vitamina E nessas condições. Entretanto, Takami *et al.* (1999) observaram que a retomada da meiose em COCs e DOs de camundongos foi inibida por uma variedade de antioxidantes fenólicos, e que as vitaminas E e C foram inativas quando adicionadas ao meio. Segundo esses autores, o mecanismo exato de inibição causado pelos antioxidantes ainda não é conhecido, mas existe a possibilidade de que as ROS induzam à retomada da meiose nessa espécie. Baseando-se no critério morfológico, os antioxidantes utilizados no presente experimento não foram citotóxicos, exceto em níveis muito altos, e as células apresentavam aparência melhor quando cultivadas com antioxidantes.

Olson e Seidel (2000) avaliaram a adição de vitamina E no desenvolvimento embrionário de bovinos. Os embriões foram cultivados em tensão de 5% de O<sub>2</sub> e um maior número de embriões atingiram o estágio de blastocisto expandido quando o meio de cultivo foi suplementado com 100µM de vitamina E. Ainda, quando transferidos para as receptoras por 7 dias, os zigotos cultivados até o estágio de mórula deram origem a embriões maiores *in vivo*. Porém, quando a vitamina C (100µM) foi adicionada ao meio juntamente com a vitamina E, o efeito positivo foi menor.

A vitamina C, *in vitro*, regenera as moléculas de vitamina E que foram submetidas ao ataque pelos radicais livres, e preservam a vitamina E reagindo

diretamente com os mesmos (CHOW e TAPPEL, 1972). Em bovinos, a concentração de  $\alpha$ -tocoferol naturalmente presente em COCs diminui pela metade durante a MIV. Mas na presença da vitamina C, a concentração de  $\alpha$ -tocoferol permanece constante (DALVIT *et al.*, 2005). Assim, seria esperado que a combinação de vitamina E e C adicionados ao meio de cultura melhore o desenvolvimento embrionário, aumentando a ação antioxidante da vitamina E. Mas, em alguns sistemas de cultivo, a vitamina C pode agir como pró-oxidante, mantendo o íon ferro e outros metais em um estado reduzido, o que promoveria a peroxidação lipídica (YAMAMOTO e NIKI, 1988), fato observado por Olson e Seidel (2000).

Tsuji *et al.* (2002) obtiveram maiores taxas de desenvolvimento de embriões de camundongos que clivaram do estágio de 1 célula até o estágio de blastocisto no meio suplementado com vitamina E, especialmente na concentração de 100 $\mu$ M, sugerindo que a vitamina E protege os embriões *in vitro* do dano oxidativo na tensão de 5% de oxigênio.

Tao *et al.* (2004) investigaram os efeitos do  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) na maturação oocitária, e na viabilidade e função das células do *cumulus* de oócitos suínos. A adição de  $\alpha$ -tocoferol (10, 100 e 200 $\mu$ M) não influenciou a expansão das células do *cumulus*, mas inibiu significativamente a fragmentação do DNA das mesmas, principalmente na concentração de 10 $\mu$ M. A concentração de 10 $\mu$ M de  $\alpha$ -tocoferol diminuiu significativamente a percentagem de VG de oócitos desnudos (DOs). Entre aqueles que passaram pelo estágio de VGBD, poucos DOs tratados com  $\alpha$ -tocoferol estavam em MI e a maioria estava em MII no momento de avaliação nuclear. Nos COCs, a presença do  $\alpha$ -tocoferol não influenciou a percentagem de oócitos em VG, nem de MI ou MII. Além disso, a concentração de 100 $\mu$ M de  $\alpha$ -tocoferol aumentou significativamente a percentagem de oócitos atípicos caracterizados por cromossomos condensados ou apresentando morfologia anormal tanto nos COCs como nos DOs. Esses resultados demonstram que o  $\alpha$ -tocoferol pode servir, em parte, como substituto das células do *cumulus* facilitando a maturação meiótica de DOs suínos.

Dalvit *et al.* (2005), avaliando as taxas de MIV, subsequente FIV e desenvolvimento embrionário bovino na presença de vitamina E (1mg/ml), vitamina C (5mmol/l) ou as duas em conjunto não constatou diferenças significativas nas percentagens de maturação, fecundação e blastocistos obtidos. Os autores sugerem que a adição de vitamina E, vitamina C ou ambas no meio de maturação não exerce efeito na maturação nuclear de oócitos bovinos e nem efeitos imediatos na maturação

citoplasmática, o que poderia indicar que concentrações fisiológicas de ROS sejam necessárias para maior competência meiótica nessa espécie.

Lima-Verde (2006), entretanto, demonstrou que o  $\alpha$ -tocoferol pode promover a ativação de folículos pré-antrais caprinos no início do cultivo, no entanto, a adição deste antioxidante nas concentrações testadas (5, 10 ou 15 $\mu$ M), reduziu a viabilidade folicular após o cultivo *in vitro*. Além disso, quando comparados com o controle, o cultivo *in vitro* levou a uma redução nas percentagens de folículos pré-antrais morfológicamente normais em todos os tratamentos com  $\alpha$ -tocoferol após 5 dias de cultivo. Ainda, a análise ultra-estrutural dos folículos mostrou que aqueles cultivados por 5 dias em meio contendo antioxidantes, estavam degenerados. Esta degeneração não ocorreu nos folículos tratados apenas com meio essencial mínimo (MEM) ou no controle, os quais mantiveram sua integridade ultra-estrutural. Segundo o autor, os diferentes resultados obtidos neste experimento em comparação aos outros autores poderia estar relacionado ao tipo de substância utilizada para a diluição dos antioxidantes, suas concentrações e a presença de outros antioxidantes no meio de cultivo. Além disso, o autor ressalta que os antioxidantes em concentrações elevadas podem agir como pró-oxidantes após certo período e que o  $\alpha$ -tocoferol tem sua ação antioxidante por um curto espaço de tempo, reagindo rapidamente com espécies oxidantes e conseqüentemente gerando radicais livres.

Hossein *et al.* (2007a) investigaram se uma suplementação isolada ou duas suplementações de  $\alpha$ -tocoferol e ácido L-ascórbico na metade de suas concentrações favoreciam o desenvolvimento embrionário suíno. Os autores também avaliaram a adição de 100 $\mu$ M de  $\alpha$ -tocoferol e 200 $\mu$ M de ácido L-ascórbico suplementados em diferentes tempos de cultivo (0, 48, 96 e 120 horas) ou suplementados na metade da concentração inicial (50 $\mu$ M de  $\alpha$ -tocoferol e 100 $\mu$ M de ácido L-ascórbico) comparando dois intervalos de tempos diferentes (0 e 48, 0 e 96 ou 48 e 96 horas) de cultivo. A suplementação do meio de cultivo com 100 $\mu$ M de  $\alpha$ -tocoferol por todo período de cultivo ou a partir das primeiras 48 horas (na concentração de 50  $\mu$ M) produziu maior percentagem de blastocistos comparados ao controle ou começando após as 96 horas de cultivo. A combinação entre os dois antioxidantes não promoveu efeito no desenvolvimento embrionário quando suplementados uma única vez, mas 2 suplementações em momentos diferentes, com concentrações divididas pela metade promoveram melhor desenvolvimento embrionário e aumentaram a qualidade dos embriões (maior número de células totais, do trofoectoderma e células do botão

embrionário) quando comparados ao controle.

### 3 ARTIGOS

#### 3.1 USO DA CISTEÍNA NA MATURAÇÃO NUCLEAR *IN VITRO* DE OÓCITOS CANINOS USE OF CYSTEIN IN *IN VITRO* NUCLEAR MATURATION OF CANINE OOCYTES

Liziane Ferraresi Holanda Cavalcante<sup>1</sup>, Artur Emílio Freitas e Silva<sup>1</sup>, Paula Rodriguez<sup>1</sup>,  
Berenice de Ávila Rodrigues<sup>2</sup>, José Luiz Rodrigues<sup>3\*</sup>

*Dissertação de Mestrado*

*Autora:* Liziane Ferraresi Holanda Cavalcante

*Orientador:* José Luiz Rodrigues

#### RESUMO

A cisteína é um composto tiol conhecido por ser um neutralizador do radical hidroxil. Em diferentes espécies mamíferas, a adição de CIS ao meio de maturação de oócitos tem sido vinculada ao aumento da síntese intracelular de glutatona (GSH), desempenhando papel importante na proteção celular contra os danos oxidativos. O objetivo deste experimento foi determinar as taxas de progressão e aquisição da meiose na maturação nuclear *in vitro* de oócitos caninos mantidos em meio TCM199-modificado acrescido de CIS (análogo *L-CIS*). Os ovários foram coletados de cadelas em diferentes estágios do ciclo estral. Após seleção morfológica, os oócitos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais: (A) Grupo controle: oócitos maturados em meio TCM-199 modificado, e (B) Grupo CIS: meio TCM-199 modificado acrescido de 0,57mM CIS. Não houve diferença estatística entre as taxas de Metáfase I/Anáfase I (MI/AI) e Metáfase II (MII) entre o grupo controle (A) (7,5%, 16/213; 1,9%, 4/213) e o grupo acrescido de CIS (B) (6,3%, 14/223; 0,9%, 2/223). Concluiu-se que, neste experimento, a utilização de TCM-199 modificado suplementado com 0,57mM de CIS não influenciou a maturação *in vitro* de oócitos

---

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Laboratório de Embriologia e Biotécnicas da Reprodução. Faculdade de Medicina Veterinária, UFRGS. Porto Alegre, RS.

<sup>2</sup>Médica Veterinária. Clínica Veterinária do Vale, Av. Getúlio Vargas 4229. São Leopoldo, RS.

<sup>3</sup>Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução. Faculdade de Medicina Veterinária, UFRGS. Porto Alegre, RS. Cx Postal 15004, 91501-970. E-mail: joseluiz.rodrigues@ufrgs.br. Autor para correspondência\*.



caninos.

**Palavras-chave:** canino, oócito, maturação *in vitro*, CIS

### ABSTRACT

Cysteine (CYS) is a thiol compound that is known to be a scavenger of hydroxyl radical. In different mammalian species, addition of CYS to maturation medium for oocytes has been linked to increased glutathione (GSH) synthesis, playing an important role in the protection against oxidative cell damage. The aim of this trial was to determine the rates of meiotic progression and competence of canine oocytes matured in modified TCM-199 added with cystein (analogue *L-Cysteine*). Ovaries were collected from bitches at different stages of oestrus cycle. After morphological selection, oocytes were randomly allocated in two experimental groups: (A) Control group: modified TCM-199 medium and (B) Cystein group: modified TCM-199 medium supplemented with 0.57mM cystein. There were no significant differences of Metaphase I/Anaphase I (MI/AI) and Metaphase II (MII) rates between oocytes in the control group (A) (7.5%, 16/213; 1.9%, 4/213) and cystein group (B) (6.3%, 14/223; 0.9%, 2/223). It was concluded that, in this study, *in vitro* nuclear maturation of domestic dog oocytes not affected by using modified TCM-199 supplemented with 0.57mM cystein.

**Key words:** canine, oocyte, *in vitro* maturation, cysteine

### INTRODUÇÃO

Apesar do empenho de vários pesquisadores em estabelecer as condições ideais para a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos caninos, as taxas de maturação nuclear raramente excedem 20% (OTOI *et al.*, 1999; LUVONI *et al.*, 2001; BOGLIOLO *et al.*, 2002; RODRIGUES e RODRIGUES 2003b; KIM *et al.*, 2004; DE LOS REYES *et al.*, 2005; LUVONI *et al.*, 2005; LUVONI e CHIGIONI, 2006; SANTOS *et al.*, 2006; VANNUCCHI *et al.*, 2006). Esta constatação está relacionada, provavelmente, às particularidades da fisiologia reprodutiva dos cánídeos, bem como à inadequação dos meios de maturação, que na maioria das vezes são baseados nos protocolos utilizados em outras espécies mamíferas (LUVONI *et al.*, 2005; LUVONI e CHIGIONI, 2006).

É conhecido que o estresse oxidativo é uma das causas do insucesso da maturação de oócitos e produção de embriões *in vitro* em várias espécies. Em condições

fisiológicas, os compostos oxigênio-reativos e os antioxidantes mantêm um equilíbrio, que se afetado, leva ao estresse oxidativo (AGARWAL *et al.*, 2005; LUBERDA, 2005; RAUSSEL e TARIN, 2005).

A glutationa ( $\gamma$ -glutamil-CIS-glicina - GSH) é o maior composto tiol sulfidril não-protéico nas células mamíferas. A GSH possui funções biológicas importantes durante a proliferação celular, transporte de aminoácidos, síntese de proteína e DNA, e redução de dissulfitos e outras substâncias químicas, protegendo assim as células contra os danos oxidativos. Sintetizada no ciclo  $\gamma$ -glutamil, a GSH depende da disponibilidade dos aminoácidos precursores, tais como a CIS, além da cistina, a cisteamina e o  $\beta$ -mercaptoetanol para a sua produção e manutenção (MEISTER e TATE, 1976; MEISTER e ANDERSON, 1983; LUBERDA, 2005; RAUSSEL e TARIN, 2005).

Em diferentes estudos, na maioria com resultados positivos, realizados em bovinos (DE MATOS e FURNUS, 2000; ALI *et al.*, 2003), suínos (ABEYDEERA *et al.*, 1998; WHITAKER e KNIGHT, 2004) roedores de laboratório (CHEN *et al.*, 2005), bubalinos, (GASPARRINI *et al.*, 2000; GASPARRINI *et al.*, 2006); caprinos (MAYOR *et al.*, 2001) e felinos (LUVONI *et al.*, 2006), a adição de compostos tiol, tais como a CIS, a cisteamina e o  $\beta$ -mercaptoetanol está associada ao aumento das concentrações de GSH intracelular culminando com o incremento das taxas de maturação nuclear oocitária. Além disso, estes compostos estimulam a maturação citoplasmática através do aumento nas taxas de formação do pronúcleo masculino após a fecundação *in vitro* e elevação das taxas de clivagem e subsequente desenvolvimento embrionário *in vitro* até o estágio de blastocisto, além de aumento na crioresistência durante a vitrificação de embriões (YOSHIDA *et al.*, 1993; DE MATOS e FURNUS, 2000; BALASUBRAMANIAN e RHO, 2007). Na espécie bovina, por exemplo, as concentrações de GSH após a MIV já foram apontadas como um indicador útil da maturação citoplasmática de oócitos *in vitro* (DE MATOS *et al.*, 1997; DE MATOS e FURNUS, 2000).

O objetivo do presente experimento foi determinar as taxas de progressão e aquisição da meiose na maturação *in vitro* de oócitos caninos mantidos em meio TCM-199 modificado, acrescido de 0,57mM de cisteína (análogo *L-cisteína*).

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os ovários foram obtidos de 14 cadelas, de raça definida (n = 4) e sem raça

definida (SRD) (n = 10), em diferentes estágios do ciclo estral, submetidas à ovariectomia no Hospital Veterinário da Universidade do Rio Grande do Sul (Av. Bento Gonçalves, 9090; Porto Alegre/RS) e no Centro de Controle de Zoonoses de Porto Alegre (Estrada Bérico José Bernardes 3489, Viamão-RS). Os pares de ovários foram pesados e avaliados quanto à presença de corpo lúteo (n = 8), folículo ou cisto (n = 2) e ausência de corpos funcionais (n = 4). A recuperação dos oócitos foi realizada pela técnica de escarificação do córtex ovariano em placa de Petri contendo PBS suplementado com 1% de soro fetal bovino (SFB) (Nutricell, São Paulo, Brasil). Os complexos *cumuli*-oócitos (COCs) foram selecionados de acordo com o critério estabelecido por Hewitt *et al.* (1998). Apenas oócitos (n = 637) de grau I (citoplasma escuro e completamente circundado por uma ou mais camadas de células do *cumulus*) e de grau II (citoplasma claro circundado por camadas incompletas de células do *cumulus*) foram utilizados para maturação. Durante a seleção sob estereomicroscópio, os oócitos foram mantidos em TCM-HEPES [TCM-199 (Sigma, M-2520, St. Louis, MO, USA), suplementado com 2,4mM de bicarbonato de sódio (Sigma, S-5761, St. Louis, MO, USA), 0,2mM de piruvato de sódio (Sigma, P-4262, St. Louis, MO, USA), 50µg/ml de gentamicina (Sigma, G1264, St. Louis, MO, USA), 1mg/ml de albumina sérica bovina (BSA) (fração livre de ácidos graxos, FAF, Sigma, A-6003, St. Louis, MO, USA)] aquecido em placa térmica a 37°C.

Os oócitos foram distribuídos aleatoriamente em um dos 2 grupos experimentais: (A) TCM-199 (Sigma, M-2520, St. Louis, MO, USA) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB – Nutricell, São Paulo, Brasil), 50µg/ml de gentamicina (Sigma, G-1264, St. Louis, MO, USA), 2,2 mg/ml de bicarbonato de sódio (Sigma, S-5761, St. Louis, MO, USA), 22µg/ml de ácido pirúvico (Merck, 1.06619.0050, Darmstadt, Alemanha), 20µg/ml de estradiol (Sigma, E-8875, St. Louis, MO, USA), 1µg/ml hormônio folículo estimulante (FSH - Folltropin-V; Vetrepharm Inc., Ont., Canadá), 0,03UI/ml de gonadotrofina coriônica humana (hCG - Profasi HP; Serono, Suíça) e 1µg/ml somatotrofina humana (hST - Lilly, FF1D44C, França) (meio controle), pH = 7,29, osmolaridade = 298; (B) tratamento (A) acrescido de 0,57mM de CIS (*L-CIS*, Sigma, C-8277, St. Louis, MO, USA), pH = 7,30, osmolaridade = 299.

Os oócitos (média de 5 oócitos por gota) (OTOI *et al.*, 2002) foram alocados em gotas de 100µl (4 gotas por placa) dos meios de maturação sob óleo mineral (Sigma, M-8410, St. Louis, MO, USA) por 72 horas, a 37°C em atmosfera saturada de 5% de CO<sub>2</sub> em ar.

Após 72 horas de cultivo, os COCs foram transferidos para uma solução de PBS modificado (modified phosphate buffered saline) (WHITTINGHAM, 1971) e desnudados gentilmente com auxílio de um tubo capilar de vidro afilado. Os oócitos foram a seguir permeabilizados e fixados em solução de paraformaldeído (PFM, Sigma, P-6148, St. Louis, MO, USA) a 3,7% e Triton X (Sigma, T-9284, St. Louis, MO, USA) por 15 minutos e na sequência imersos em solução de polivinil-pirrolidona (PVP, Sigma, P-0930, St. Louis, MO, USA) a 2% em PBS por mais 15 minutos (RODRIGUES e RODRIGUES, 2003b). Grupos de 5 oócitos foram colocados entre lâmina e lamínula selada com cola e esmalte incolor, e corados com Hoechst (Sigma, 33342, St. Louis, MO, USA), em glicerol (Sigma, G-5516, St. Louis, MO, USA), (10µg/ml). Na avaliação da cromatina nuclear sob microscópio de epifluorescência (ZEISS, Axiovert 135) foram observados os estádios de desenvolvimento oocitário classificados como vesícula germinal (VG), vesícula germinal descondensada (VGBD), Metáfase I/Anáfase I (MI/AI), Metáfase II (MII), degenerados ou com cromatina indefinida (outros).

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software SPSS, versão 13.0. Os dados foram analisados pelo teste Qui-quadrado com ajuste residual. O teste de Fisher foi utilizado para comparar a maturação nuclear dos oócitos. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $P < 0,05$ . Esse experimento constituiu-se de 10 replicações.

## RESULTADOS

Devido às perdas durante o processamento, dos 637 oócitos submetidos ao cultivo, 436 (68,5%) foram corados e avaliados quanto à maturação nuclear.

Apesar do percentual de oócitos que realizaram a retomada e a progressão da meiose até a MII, ter sido numericamente superior no grupo controle (18,8%, 40/213) em relação ao grupo suplementado com CIS (13,5%, 30/223), estas taxas não foram estatisticamente diferentes ( $P = 0,160$ ). Assim como os resultados de progressão da meiose, que após a maturação *in vitro* dos oócitos não mostraram influência positiva da presença de CIS no meio TCM-199, também não foram verificadas diferenças significativas no número de oócitos que alcançaram a MII, entre os dois grupos experimentais ( $P = 0,394$ ).

Adicionalmente, a suplementação com CIS também não foi suficiente para

diminuir a taxa de oócitos com cromatina degenerada ou de caráter indefinido (Tabela 1).

**Tabela 1 – Maturação nuclear *in vitro* de oócitos caninos expostos à CIS**

Tratamento	N	VG (%)	VGBD (%)	MI/AI (%)	MII (%)	Outros (%)
A (controle)	213	32 (15,0)	20 (9,4)	16 (7,5)	4 (1,9)	142 (66,2)
B (0,57mM CIS)	223	27 (12,1)	14 (6,3)	14(6,3)	2 (0,9)	166 (74,4)

VG: vesícula germinal; VGBD: quebra de vesícula germinal; MI/AI: Metáfase/Anáfase I; MII: Metáfase II; outros: indefinidos ou com a cromatina degenerada.

## DISCUSSÃO

Em cães, a adição de CIS, de cisteamina e do  $\beta$ -mercaptoetanol no meio de maturação (TCM-199) tem sido referenciada na literatura como benéfica à MIV, sendo responsável pelo aumento das concentrações de GSH intracelular de oócitos obtidos de cadelas na fase folicular do ciclo estral, assim como no aumento da taxa de oócitos que alcançaram o estágio de MII em percentuais que variam de 13 a 20% (KIM *et al.*, 2004; HOSSEIN *et al.*, 2007b; KIM *et al.*, 2007). Apesar dessas observações, ainda existem controvérsias levando-se em consideração os dados obtidos em experimentos com diferentes espécies mamíferas. De acordo com Chen *et al.* (2005), por exemplo, a presença de CIS no meio de maturação proporcionou um significativo aumento nas taxas de maturação nuclear de oócitos murinos. Ao contrário, em suínos, este comportamento não pôde ser observado (ABEYDEERA *et al.*, 1998). Também em caprinos, a adição de CIS no meio de maturação não parece ser necessária para aumentar as taxas de MII oocitária em experimentos *in vitro*, indicando que as concentrações de GSH antes do início do processo de meiose provavelmente sejam suficientes para a maturação nuclear nessa espécie (MAYOR *et al.*, 2001). Igualmente, Yoshida *et al.* (1993), observaram que durante a MIV de oócitos suínos, a redução da concentração intracelular de GSH não exerce influência na maturação nuclear. Isto sugere que a função principal da CIS não esteja relacionada à elevação dos índices de maturação nuclear. Da mesma forma, Pires (2006) não observou melhora nas taxas de MII adicionando CIS e/ou cisteamina ao meio de maturação de oócitos caninos. A adição de compostos antioxidantes no meio de maturação, o qual tornaria o ambiente mais favorável para aquisição da competência meiótica, através do seu efeito protetor, não foi observado, fato também encontrado em nosso experimento, onde as taxas de MII entre os meios não diferiram estatisticamente

entre si.

Concentrações de CIS entre 0,02mM e 3,3mM foram testadas na espécie suína, sendo obtidos melhores resultados com concentrações elevadas (ABEYDEERA *et al.*, 1998; WHITAKER e KNIGHT, 2004). Contudo, Yoshida *et al.* (1993) demonstraram que concentrações equivalentes a 0,04mM são efetivas para suportar a MIV de oócitos de suínos. Já em caninos, Hossein *et al.* (2007b) descrevem que, apenas altas concentrações, equivalentes ou maiores que 0,5mM, são eficientes para aumentar as taxas oocitárias de MII. Entretanto, em nosso experimento, a presença de 0,57mM de CIS no meio de maturação não foi suficiente para melhorar as taxas de oócitos que alcançaram o estágio de MII, uma observação semelhante e consistente com as taxas obtidas no experimento realizado por Pires (2006). Também, o intervalo de tempo usado na maturação dos ovócitos (72 horas), corresponde aos previamente adotados em vários protocolos de MIV canina (OTOI *et al.*, 2002; BOGLIOLO *et al.*, 2002; RODRIGUES e RODRIGUES, 2003b; KIM *et al.*, 2005; LUVONI e CHIGIONI, 2006; VANNUCCHI *et al.*, 2006). Ainda assim, essas medidas não foram suficientes para elevar as taxas de maturação nuclear no presente experimento, confrontando um experimento conduzido anteriormente (HOSSEIN *et al.*, 2007b). É possível atribuir esses resultados à competência meiótica presuntiva dos oócitos utilizados em nosso experimento, assim como às condições de cultivo aos quais os oócitos foram submetidos.

A influência do estágio do ciclo estral no sucesso das taxas da MIV canina ainda é um tema sob debate. Apesar de vários autores considerarem a superioridade dos oócitos coletados durante o estágio folicular e luteal (KIM *et al.*, 2004; HOSSEIN *et al.*, 2007b) àqueles coletados no anestro, alguns estudos mostram que o tamanho do oócito e do folículo são os fatores determinantes da competência meiótica *in vitro* ao invés da fase do ciclo estral (RODRIGUES e RODRIGUES, 2003a, SONGSASEN e WILDT, 2005). Estudos recentes demonstram que a morfologia dos oócitos caninos imaturos varia entre os diferentes estágios do ciclo estral e que no anestro os oócitos possuem muito menos células do *cumulus* e ausência de células da granulosa (KIM *et al.*, 2004). Entretanto, cabe ressaltar que, em experimento realizado recentemente em nosso laboratório, avaliando a qualidade e a integridade da cromatina de oócitos caninos imaturos através do emprego do corante azul cresil brilhante (BCB), não foram observadas diferenças estatísticas nos parâmetros acima citados entre cadelas com diferentes valores sanguíneos de progesterona (RODRIGUES *et al.*, 2008), sugerindo

que oócitos proveniente de vários estágios do ciclo estral podem apresentar características suficientes para desenvolvimento *in vitro*. Mas, considerando-se a importância das células do *cumulus* na utilização dos compostos tiol como substrato na síntese de GSH, espera-se que oócitos coletados durante o anestro, onde grande parte é derivada de folículos atrésicos ou degenerados, tenham sua competência meiótica reduzida (KIM *et al.*, 2004, HOSSEIN *et al.*, 2007b), e uma menor capacidade em sintetizar GSH pela utilização da CIS (DE MATOS *et al.*, 1997; KA *et al.*, 1997; YAMAUCHI e NAGAI, 1999; KIM *et al.*, 2007). Kim *et al.* (2004), avaliando a influência do  $\beta$ -mercaptoetanol na maturação nuclear de oócitos caninos, observaram alta proporção de oócitos que alcançaram MII quando coletados na fase folicular, comparados àqueles coletados de ovários de fêmeas em anestro ou diestro. Já Pires (2006), utilizando apenas oócitos provenientes da fase folicular, não evidenciou qualquer melhora nas taxas de oócitos que alcançaram MII na presença de CIS e/ou cisteamina. Segundo Pires (2006), o estresse oxidativo induzido pela alta tensão de oxigênio, à qual o oócito é exposto durante o cultivo, assim como a manipulação do oócito no processo de maturação, leva à mobilização de grande quantidade de glutatona, promovendo o acentuado declínio dos seus níveis, justificando a baixa competência meiótica dos oócitos maturados em meio suplementado com antioxidantes, e justificando também os resultados observados no nosso experimento.

Outros aspectos a serem considerados são as características individuais dos animais incluídos no experimento, tais como, idade, raça e motivo pelo qual as fêmeas teriam sido submetidas à cirurgia, embora tais aspectos não estejam bem esclarecidos no que concerne à influência na qualidade dos oócitos (RODRIGUES e RODRIGUES, 2003a; LUVONI e CHIGIONI, 2006).

Os efeitos dos compostos tiol de baixo peso molecular, tais como, CIS, cisteamina e  $\beta$ -mercaptoetanol, são desconhecidos na retomada da meiose (HOSSEIN *et al.*, 2007b). Na presença de cisteamina, Abeydeera *et al.* (1998) não constataram melhora na taxa de retomada de meiose de oócitos suínos, diferentemente do observado por Chen *et al.* (2005), que enfatizaram uma elevação nas taxas de maturação nuclear em oócitos de camundongos na presença deste composto. Segundo Hossein *et al.* (2007b), na fase folicular do ciclo estral canino, há um aumento no número de oócitos que alcançaram o estágio de MII na presença de CIS e cisteamina no meio de maturação. Entretanto, dentro do mesmo estágio do ciclo estral, não existem diferenças nas taxas de retomada de meiose. Esses autores consideram que a CIS, em fornecendo

melhores condições por sua atividade antioxidante e sua influência positiva na síntese de DNA, poderia ter ajudado os oócitos que retomaram a meiose, a completarem o seu desenvolvimento até MII. Já Pires (2006) atribui o aparente aumento no índice de VGBD observado em seu experimento à própria fase do ciclo estral (folicular), onde a onda pré-ovulatória de LH reduziria a comunicação existente entre as células do *cumulus* e o oócito, interrompendo o transporte de substâncias que inibem a competência meiótica e indiretamente promovendo a quebra da vesícula germinal, além do aumento intra-oocitário do cálcio que, conseqüentemente, causa redução do AMPc. Em nosso experimento, a presença de CIS também não foi suficiente para o aumento da retomada da meiose, nem mesmo nos oócitos provenientes de cadelas que estavam em fase folicular de acordo com a avaliação morfológica ovariana realizada por ocasião da coleta dos ovários.

O meio base para a MIV empregado em nosso experimento foi o TCM-199, o qual é utilizado freqüentemente nos sistemas de cultivo de oócitos caninos (OTOI *et al.*, 1999; DE LOS REYES *et al.*, 2005; LUVONI e CHIGIONI, 2006; VANNUCCHI *et al.*, 2006; HOSSEIN *et al.*, 2007b; RODRIGUES *et al.*, 2007). O uso de um meio combinado e/ou um meio com suplementação protéica (soro fetal bovino ou albumina bovina sérica) dificulta o isolamento do papel individual dos substratos. Uma das maiores vantagens da utilização de meios isentos de proteínas é a eliminação da potente influência de fatores conflitantes, como por exemplo, o soro fetal bovino (BAVISTER, 1995). Em nosso experimento, utilizamos o soro fetal bovino como suplementação protéica. Fatores de crescimento e outros hormônios estão presentes no soro e na albumina sérica não purificada, além de conter fatores desconhecidos que podem interagir com outros componentes do meio e mascarar os efeitos dos mesmos, dificultando a interpretação dos resultados (WANG e DAY, 2002). Pouco se sabe a respeito da interação da CIS com os componentes do soro e que poderiam ter influenciado os nossos resultados.

Além disso, condições de cultivo ambientais como temperatura e concentração de oxigênio podem ser incluídas entre os fatores implicados nos resultados deste experimento. A alta concentração de oxigênio (20%) do meio, utilizada nas técnicas de reprodução assistida em humanos tem sido associada ao baixo desenvolvimento de embriões *in vitro* (AGARWAL *et al.*, 2005). Sabe-se que tensões de oxigênio elevadas podem gerar espécies oxigênio-reativas durante o cultivo embrionário e estas exercem efeitos deletérios às células, tais como, dano ao DNA, peroxidação lipídica e



modificação oxidativa das proteínas (JOHNSON e NASR-ESFAHANI, 1994). A utilização de baixas concentrações de oxigênio associada aos antioxidantes no sistema de cultivo de oócitos de mamíferos encontra-se sob investigação. Em cães, a tensão de oxigênio parece não exercer efeito na maturação nuclear *in vitro* (SONGSASEN *et al.*, 2001). No entanto, é interessante salientar que, em recente experimento realizado em nosso laboratório, Silva *et al.* (2008) encontraram índices mais elevados de apoptose das células do *cumulus* quando oócitos caninos foram cultivados *in vitro* sob alta tensão de oxigênio (20%). Por outro lado, a adição de 0,05-0,6mM de CIS durante a MIV de oócitos suínos, sob baixa tensão de oxigênio (5%), aumentou significativamente a síntese de GSH intracelular, mas não houve efeitos na maturação nuclear, fecundação, formação do pronúcleo masculino e desenvolvimento embrionário (LINH *et al.*, 2007). Em bovinos, a adição de cisteamina e/ou fator de crescimento epidérmico foi mais eficiente para MIV de oócitos na tensão de oxigênio de 20%, resultando em aumento da clivagem, quando comparada à tensão de 5% de oxigênio (OYAMADA e FUKUI, 2004). Segundo Van Soom *et al.* (2002), a taxa de apoptose celular em blastocistos bovinos é menor quando utilizada a tensão baixa de oxigênio no meio sem adição de CIS. Em nosso experimento, os oócitos foram expostos à tensão elevada de oxigênio (20%), compatível, segundo os relatos de literatura, com uma maior produção de espécies reativas ao oxigênio (JOHNSON e NASR-ESFAHANI, 1994; AGARWAL *et al.*, 2005). Apesar desses resultados, não se conhece a existência de relatos referentes à avaliação da utilização de antioxidantes sobre a MIV de oócitos caninos mantidos em baixa tensão de oxigênio.

Por fim, sabe-se que a CIS é extremamente instável no meio de cultivo, sendo rapidamente oxidada em cistina em aproximadamente 1 hora (BANNAI, 1984). A cistina não é permeável à célula e esta deveria ser oxidada novamente no ciclo  $\gamma$ -glutamil para CIS (MEISTER e TATE, 1976; MEISTER e ANDERSON, 1983). Dessa forma, considera-se a possibilidade de que no momento da maturação, quase nenhuma CIS estaria disponível no meio de MIV, em decorrência do pré-equilíbrio recomendado em estufa, conforme exige a técnica. Além disso, em um experimento realizado por Sawai *et al.* 1997, a presença de CIS no meio foi crucial apenas entre 42 e 48 horas de cultivo de oócitos suínos. Assim, talvez fosse mais apropriado a inclusão da CIS em uma etapa posterior ao momento zero do CIV de oócitos caninos.

Em suma, vários aspectos ainda não esclarecidos podem estar implicados nos resultados de competência meiótica dos oócitos incluídos neste experimento. Estudos

adicionais sobre o teor e disponibilidade da CIS no meio de maturação, interação com outras substâncias presentes no meio, assim como tensão de oxigênio à qual os oócitos são submetidos *in vitro* precisam ainda ser realizados. Finalmente, os atuais desafios na MIV de oócitos caninos são adquirir competência meiótica que suporte a fecundação e o desenvolvimento embrionário, além da necessidade de definir condições apropriadas que permitam a síntese de GSH intracelular requerida para a maturação nuclear e citoplasmática.

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados acima expostos, conclui-se que no presente experimento, a adição de 0,57mM de CIS ao meio de maturação não influenciou as taxas de progressão e aquisição da meiose na maturação nuclear de oócitos caninos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (HCV-UFRGS, RS, Brasil) e ao Centro de Controle de Zoonoses de Porto Alegre (RS, Brasil) por generosamente disponibilizar os ovários caninos.

Ao CNPq pela concessão de bolsa de estudo para a realização desse trabalho.

## REFERÊNCIAS

ABEYDEERA, L.R. *et al.* Presence of  $\beta$ -mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocyst development after *in vitro* fertilization. **Theriogenology**, v.50, p.747-756, 1998.

AGARWAL, A. *et al.* Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.3, n.28, p.1-21, 2005.

ALI, A.A. *et al.* Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, v.59, p.939-949, 2003.

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

BANNAI, S. Transport of cystine and cysteine in mammalian cells. **Biochimica et Biophysica Acta** – Review on Biomembranes, v.779, p.289–306, 1984.

BAVISTER B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Human Reproduction Update**, v.1, n.2, p. 91-148, 1995.

BOGLIOLO, L. *et al.* Influence of co-culture with oviductal epithelial cells on *in vitro* maturation of canine oocytes. **Reproduction Nutrition Development**, v.42, p.265-273, 2002.

CHEN, N. *et al.* Influence of cysteamine supplementation and culture in portable dry-incubator on the *in vitro* maturation, fertilization and subsequent development of mouse oocytes. **Theriogenology**, v.63, p.2300-2310, 2005.

DE LOS REYES, M. *et al.* Effect of human chorionic gonadotrophin supplementation during different culture periods on *in vitro* maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v.64, p.1-11, 2005.

DE MATOS, D.G. *et al.* Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1420–1425, 1997.

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

GASPARRINI, B. *et al.* Effect of cysteamine during *in vitro* maturation on buffalo embryo development. **Theriogenology**, v.54, p.1537-1542, 2000.

GASPARRINI, B. *et al.* Enrichment of *in vitro* maturation medium for buffalo (*bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. **Theriogenology**, v.65, p.275-287, 2006.

HEWITT, D.A. *et al.* Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. **Theriogenology**, v.49, n.6, p.1083-1101, 1998.

HOSSEIN, M.S. *et al.* Effects of thiol compounds on *in vitro* maturation of canine oocytes collected from different reproductive stages. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p.1213-1220, 2007b.

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

KA, H.H. *et al.* Amino acids in maturation medium and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matures and penetrated *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1478-1483, 1997.

KIM, M.K. *et al.* Effect of  $\beta$ -mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on *in vitro* maturation of canine oocytes from dogs with different stages of the estrus cycle. **Journal of Veterinary Science**, v.5, n.3, p.253-258, 2004.

KIM, M.K. *et al.* Effects of estradiol-17 $\beta$  and progesterone supplementation on *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v.63, p.1342-1353, 2005.

KIM, M.K. *et al.* Glutathione content of *in vivo* matured canine oocytes collected from different reproductive stages. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.69, n.6, p.627-632, 2007.

LINH, N.V. *et al.* Effects on cysteine in IVM media on *in vitro* maturation under low oxygen tension, *in vitro* fertilization, and *in vitro* culture of porcine oocytes [abstract 247]. In: **Reproduction, Fertility and Development**, v.20, n.1, p.203, 2007. (abstract)

LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reproductive Biology**, v.5, n.1, p.5-17, 2005.

LUVONI, G.C. *et al.* Influence of different stages of the oestrous cycle on cumulus-oocyte communications in canine oocytes: effects on the efficiency of *in vitro* maturation. **Journal of Reproduction and Fertility (Supplement)**, v.57, p.141-146, 2001.

LUVONI, G.C. *et al.* Factors involved *in vivo* and *in vitro* maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v.63, p.41-59, 2005.

LUVONI, G.C., CHIGIONI, S. Culture strategies for maturation of carnivore oocytes. **Theriogenology**, v.66, p.1471-1475, 2006.

LUVONI *et al.* Effect of gonadotropins during *in vitro* maturation of feline oocytes on oocyte-cumulus cells functional coupling and intracellular concentration of glutathione. **Animal Reproduction Science**, v.96, n.1-2, p. 66-78, 2006.

MAYOR, P. *et al.* Effects of the addition of glutathione during maturation on *in vitro* fertilization of prepubertal goat oocytes. **Zygote**, v.9, p.323-330, 2001.

MEISTER, A., ANDERSON, M.A. 1983. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v.52, p.711-760, 1983.

MEISTER, A., TATE, S.S. Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. **Annual Review of Biochemistry**, v.45, p.559-604, 1976.

OTOI, T. *et al.* Effect of serum on the *in vitro* maturation of canine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v.1, p.387-390, 1999.

OTOI, T. *et al.* Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. **Reproduction**, v.124, n.6, p.775-781, 2002.

OYAMADA, T., FUKUI, Y. Oxygen tension and medium supplements for *in vitro* maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. **Journal of Reproduction and Development**, v.50, p.107-117, 2004.

PIRES, E.A. **Efeito da suplementação de CIS e cisteamina sobre a maturação**

**nuclear de oócitos de fêmeas caninas (*Canis familiaris*) obtidos por ováriosalpingo-histerectomia durante a fase pré-ovulatória do estro.** 66 p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, Universidade Estadual Paulista, 2006.

RAUSSEL, F., TARIN, J.J. Función del glutatión educido durante la maduración y fecundación de ovocitos desarrollo pre-implantatorio de embriones *in vitro* en mamíferos. **Revista Iberoamericana de Fertilidad**, v.22, n.6, p.414-429, 2005.

RODRIGUES, B.A., RODRIGUES, J.L. Influence of reproductive status on *in vitro* oocyte maturation. **Theriogenology**, v.60, p.59-66, 2003a.

RODRIGUES, B.A., RODRIGUES, J.L. Meiotic response of *in vitro* matured canine oocytes under different proteins and heterologous hormone supplementation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, n.1, p.58-62, 2003b.

RODRIGUES, B.A. *et al.* Effect of maturation medium on *in vitro* cleavage of canine oocytes fertilized with fresh and cooled homologous semen. **Zygote**, v.15, p.43-53, 2007.

RODRIGUES, B.A. *et al.* Preliminary study in immature canine oocytes stained with brilliant cresyl blue (BCB) and obtained from bitches with low and high progesterone serum profiles. **Proceedings of the 6<sup>th</sup> ISCFR (International Symposium on Canine and Feline Reproduction) & 6<sup>th</sup> Biannual EVSSAR Congress.** (eds G. England, P.Concannon, S. Schäfer-Somi), p. 199-200. Vienna, Austria, 2008.

SANTOS, L.C. *et al.* *In vitro* nuclear maturation of bitch oocytes in the presence of polyvinyl-pyrrolidone. **Animal Reproduction**, v.3, n.1, p.70-75, 2006.

SILVA, A.E.F. *et al.* The influence of oxygen tension on cumulus cell viability of canine COCs matured in high-glucose medium. **Proceedings of the 6<sup>th</sup> ISCFR (International Symposium on Canine and Feline Reproduction) & 6<sup>th</sup> Biannual EVSSAR Congress.** (eds G. England, P.Concannon, S. Schäfer-Somi), p.226-228. Vienna, Austria, 2008.

SONGSASEN, N. *et al.* Effects of maturation media and oxygen concentration on nuclear maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v.55, n.1, p.494, 2001.

SONGSASEN, N., WILDT, D.E. Size of the donor follicle, but not stage of reproductive cycle or seasonality, influences meiotic competency of selected domestic dog oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.72, n.1, p.113-119, 2005.

VANNUCCHI, C.I. *et al.* *In vitro* canine oocyte nuclear maturation in homologous oviductal cell co-culture with hormone supplemented media. **Theriogenology**, v.66, p.1677-1681, 2006.

VAN SOOM, A. *et al.* Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. **Theriogenology**, v.57, p.1453-1465, 2002.

WANG, W.H., DAY, B.N. Development of porcine embryos produced by IVM/IVF in a medium with or without protein supplementation: effects of extracellular glutathione. **Zygote**, v.10, n.2, p.109-115, 2002.

WHITAKER, B.D., KNIGHT, J.W. Exogenous  $\alpha$ -glutamyl cycle compounds supplemented to in vitro fertilization, culture, and viability parameters of porcine oocytes and embryos. **Theriogenology**, v.62, p.311-322, 2004.

WHITTINGHAN, D.G. Culture of mouse ova. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.48, n.14, p.7-21. 1971.

YAMAUCHI, N., NAGAI, T. Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after in vitro maturation in the presence of cysteamine. **Biology of Reproduction**, v.61, p.828-833, 1999.

YOSHIDA, M. *et al.* Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronuclear. **Biology of Reproduction**, v.49, p.89-94, 1993.

### 3.2 *IN VITRO* NUCLEAR MATURATION OF CANINE OOCYTES IN THE PRESENCE OF $\alpha$ -TOCOPHEROL

Liziane Ferraresi Holanda Cavalcante<sup>1</sup>, Artur Emílio Freitas e Silva<sup>1</sup>, Berenice de Ávila Rodrigues<sup>2</sup>, José Luiz Rodrigues<sup>3\*</sup>

*Master's Dissertation*

*Author:* Liziane Ferraresi Holanda Cavalcante

*Adviser:* José Luiz Rodrigues

#### ABSTRACT

Alpha-tocopherol (vitamin E) is the predominant lipid-soluble antioxidant in animal cells. It acts protecting cells from oxygen radical damage, and it is the primary free radical scavenger in mammalian cell membranes. The purpose of these trials was to determine the rates of progression and nuclear meiotic competence of canine oocytes matured in modified TCM-199 added with  $\alpha$ -tocopherol. Two independent experiments were performed. The ovaries were removed by ovariectomy from 9 bitches in experiment 1 and from 10 bitches in experiment 2 at various stages of the estrous cycle. After *cumuli* oocyte complexes (COCs) morphologic selection, oocytes were randomly allocated in three treatment groups under different concentrations of  $\alpha$ -tocopherol, as following: in 0, 10, and 50 $\mu$ M in treatment 1 and 0, 100, and 500 $\mu$ M in treatment 2. The oocytes were matured for 72 hours at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air. In experiment 1, there were no significant differences in the rates of Metaphase I to Metaphase II among treatments: control (26.8%, 29/108), 10 $\mu$ M (22.6%, 26/115) and 50 $\mu$ M (29.1%, 30/103). In experiment 2, the percentage of oocytes that resumed meiosis (GVBD to MII) was 31.9% (31/97), 34.9% (39/112) and 51.5% (54/105) for control, 100 and 500 $\mu$ M  $\alpha$ -tocopherol treatments respectively ( $P < 0.05$ ). However, no improvement on rates of metaphase II (MII) was observed with either 100 $\mu$ M (0.9%, 1/112), or 500 $\mu$ M (1%, 1/105)  $\alpha$ -tocopherol as supplement in maturation medium. It

---

<sup>1</sup> Laboratory of Embriology and Biotechniques of Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul; Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Veterinarian. Vale Veterinary Clinic, Av. Getúlio Vargas 4229. São Leopoldo, RS.

<sup>3</sup> Department of Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul; Cx. Postal: 15004, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: joseluiz.rodrigues@ufrgs.br. Corresponding author\*.

was concluded that *in vitro* nuclear maturation of dog oocytes can be achieved using modified TCM-199 supplemented with  $\alpha$ -tocopherol, but it was not enough to enhance oocytes maturation until MII.

**Key words:** canine, oocyte, *in vitro* maturation,  $\alpha$ -tocopherol, oxidative stress

## INTRODUCTION

*In vitro* maturation (IVM) of canine oocytes is a critical step in *in vitro* production (IVP) of canine embryos and, for this reason many studies have been carried out to test different culture conditions. Nevertheless, the efficiency of *in vitro* maturation of canine oocytes is very low compared to that of other mammals (YAMADA *et al.*, 1993; BOLAMBA *et al.*, 1998; HEWITT and ENGLAND, 1999a, FUJII *et al.*, 2000, SAINT-DIZIER *et al.*, 2001, BOGLIOLO *et al.*, 2002, SONGSASEN *et al.*, 2002, LUVONI *et al.*, 2003, RODRIGUES and RODRIGUES, 2003b, and KIM *et al.*, 2005).

Oxidative stress is involved in the etiology of defective oocyte and embryo development. Definitively, oocytes cultured *in vitro* are challenged to oxidative stress, a condition determined by recovery and culture whereby exposure to light, elevated oxygen (O<sub>2</sub>) concentrations, and disturbed concentrations of metabolic substrates, leads to increased levels of reactive oxygen species (ROS) and that cause lipid peroxidation of cellular membranes (DALVIT *et al.*, 2005, GUÉRIN *et al.*, 2001). Although, ROS serve as key signal in physiological processes, participating in various cell mechanisms inducing tissue remodeling, hormone signaling, steroidogenesis and germ cell function it is thought that ROS are implicated in pathological processes of the female reproductive tract. ROS modify normal cell functions, compromises cell survival, especially when critical concentration is overwhelmed and the balance between ROS and antioxidants is disturbed (AGARWAL *et al.*, 2005; DROGE, 2002). As free radical species are unstable and highly reactive, they become stable by acquiring electrons from nucleic acids, lipids, proteins, carbohydrates, or any nearby molecule, causing a cascade of chain reactions resulting in cellular damage and disease (AGARWAL *et al.*, 2008). In rats, an inadequate protection against the damaging effects of ROS can cause atresia of ovarian follicles and apoptosis of granulosa cells (TILLY and TILLY, 1995). Thus, reproductive cells and tissues remain stable when free radical production and the scavenging antioxidants remain in balance (AGARWAL *et al.*, 2008). *In vivo*, oocytes



and embryos seem to be protected against oxidative stress by oxygen scavengers present in follicular and oviductal fluids (GUÉRIN *et al.*, 2001). Therefore, the protection of oocytes and embryos against oxidative stress during *in vitro* culture it is important and one approach is to supplement the medium with antioxidant compounds (JEONG *et al.*, 2006).

Polyunsaturated lipids of cellular membranes are very susceptible to peroxidation by ROS (CHOW, 1991; LIEBLER, 1993). As lipid peroxidation occurs as a chain reaction, the reaction expands to surrounding phospholipids, including the intracellular (TAPPEL, 1980). The canine oocyte is characterized by the presence of large amounts of lipid yolk material that gives a dark and homogeneous appearance to the oocyte (GURAYA, 1965). It is likely that oocytes in this species are particularly susceptible to oxidative stress (McEVOY *et al.*, 2000; STURNEY and LEESE, 2003).

Alpha-tocopherol is the predominant lipid-soluble antioxidant in animal cells. In addition, is well known that alpha-tocopherol act as a ROS scavenger *in vivo* and *in vitro* (CHOW, 1991). It has been observed that  $\alpha$ -tocopherol, the most active form of vitamin E, is present in cellular membranes and acts as a protective liposoluble agent against lipoperoxidation by removing peroxy and alcoxyl radicals, and generating the poorly reactive tocopheryl radical (CHOW, 1991; LIEBLER, 1993).

Moreover, vitamin E present in the diet can modulates hydrogen peroxide production in mitochondria, regulating the ROS production and, thereby delaying or preventing degenerative tissue changes, counteracting the negative effects of reduction on the number of ovarian oocytes and increased oocyte apoptosis in aged females (CHOW *et al.*, 1999, TARIN *et al.*, 1998a).

Dalvit *et al.* 2005 point some discrepancies on ROS requirements for *in vitro* maturation (IVM), fertilization and embryo development. It has been suggested that some ROS are required for oocyte maturation (TAKAMI *et al.*, 1999). It was observed that, at higher concentrations,  $\alpha$ -tocopherol produced toxic effects in murine embryos produced *in vitro* (WANG *et al.*, 2002), while in other study, there was no effect on murine oocyte maturation (TAKAMI *et al.*, 1999). In the bovine species, addition of  $\alpha$ -tocopherol during maturation impaired the acquisition of oocyte developmental competence, and the presence of  $\alpha$ -tocopherol or ascorbic acid in the maturation media failed to modify the percentage of blastocysts (DALVIT *et al.*, 2005). Paradoxically, Olson and Seidel (2000), reported that the addition of  $\alpha$ -tocopherol in culture medium for bovine embryos improved the embryonic developmental competence up to and

including the blastocyst stage. Beneficial effects on the development of porcine embryos *in vitro* fertilized were observed in medium supplemented with 100 $\mu$ M  $\alpha$ -tocopherol at a one or twice step with divided concentrations (HOSSEIN *et al.*, 2007a). According to Jeong *et al.* (2006) supplementation with  $\alpha$ -tocopherol (100 $\mu$ M) improved both the frequency of blastocyst formation and its quality; additionally, the authors reported that number of apoptotic blastomeres in porcine embryos was significantly reduced, when  $\alpha$ -tocopherol (100 $\mu$ M) was added in medium. Likewise, porcine denuded oocytes exposure to  $\alpha$ -tocopherol resulted in the development to the MI to MII stages and cumulus cell DNA fragmentation was prevented, especially at 10 $\mu$ M concentrations (TAO *et al.*, 2004). However, the same concentration of  $\alpha$ -tocopherol reduced the follicular viability after *in vitro* culture of goat preantral follicles (LIMA-VERDE, 2006).

The aim of those experiments to determine the nuclear maturation rates were to determine the nuclear maturation rates of canine oocytes exposed to TCM-medium supplemented with different  $\alpha$ -tocopherol concentration.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *OVARIES AND COCs COLLECTION*

Ovaries were obtained from 9 purebred ( $n = 5$ ) and crossbred ( $n = 4$ ) domestic bitches (experiment 1) and 10 purebred ( $n = 4$ ) and crossbred ( $n = 6$ ) domestic bitches (experiment 2) with an average age of 5 years. Females underwent ovariohysterectomy at the Veterinary Hospital of the Universidade do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9090 – (Porto Alegre/RS; Brazil) and Zoonosis Control Center, Estrada Bérico José Bernardes 3489 (Porto Alegre/RS). The study complied with the animal welfare regulations in Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).

The ovaries were weighted (g) and macroscopic assessed for the presence of corpora lutea ( $n = 7$ ), follicles or cysts ( $n = 1$ ) and absence of corpora lutea or follicles ( $n = 1$ ) in experiment 1; presence of corpora lutea ( $n = 8$ ), follicles or cysts ( $n = 0$ ) and absence corpora lutea or follicles ( $n = 2$ ) in experiment 2. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were recovered by slicing the ovaries in phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 1% fetal calf serum (FCS) (Nutricell, São Paulo, Brazil) at 37°C and graded according to the criteria reported by Hewitt *et al.* (1998). Only grade 1

(darkly pigmented and completely surrounded by one or more layers of cumulus cells) and grade 2 COCs (lightly pigmented with incomplete layers of cumulus cells) ( $n = 326$ ) in treatment 1 and ( $n = 314$ ) in treatment 2 were selected for culture.

#### *IN VITRO MATURATION*

In experiment I the oocytes were randomly allocated to the following treatments: **0 $\mu$ M**: control group, **10 $\mu$ M**: control group plus 10 $\mu$ M  $\alpha$ -tocopherol (Sigma, T-3126, St. Louis, MO, USA), and **50 $\mu$ M**: control group plus 50 $\mu$ M  $\alpha$ -tocopherol. Experiment 2: **100 $\mu$ M**: control group plus 100 $\mu$ M of  $\alpha$ -tocopherol, and **500 $\mu$ M**: control group plus 500 $\mu$ M  $\alpha$ -tocopherol.

Control group (0 $\mu$ M  $\alpha$ -tocopherol) was similar for treatment 1 and 2, and was constituted of TCM-199 buffered with 2.2 mg/ml sodium bicarbonate (GIBCO 1115059), 50 $\mu$ g/ml gentamicin (Sigma, G-1264, St. Louis, MO, USA), 22 $\mu$ g/ml pyruvic acid (Merk, 1.06619.0050, Germany), 20 $\mu$ g/ml estradiol (Sigma, E-8875, St. Louis, MO, USA), 0.5 $\mu$ g/ml FSH (Folltropin-V; Vetrepharm Inc.), 0.03UI/ml hCG (Profasi HP; Serono, Switzerland) 0.1% polyvinyl alcohol (Sigma, P-8136, St. Louis, MO, USA) and 5.5 mM glucose (Merk, 108337, Germany), pH = 7,36, osmolarity = 300.

Aliquots of 10, 50, 100, 500 $\mu$ M  $\alpha$ -tocopherol (Sigma, T-3126) in ethanol (Sigma E-2385) solution were protected from light in aluminum foil in eppendorfs, and stored at 4°C, till dilution in 2ml of TCM199 culture medium before oocyte incubation.

COCs (on average 5 COCs per group) were incubated at 37°C for 72 hours in Petri dishes with 100 $\mu$ l droplets of maturation media under mineral oil (Sigma, M-8410, St. Louis, MO, USA) in a 100% humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> in air.

#### *ASSESSMENT OF NUCLEAR MATURATION*

After 72 hours of *in vitro* culture, oocytes were transferred into 400  $\mu$ l of phosphate-buffered saline (PBS) solution and denuded of cumulus cells by mechanical displacement using a small-diameter glass micropipette. After that, oocytes were permeabilized in Triton X (Sigma, T-9284, St. Louis, MO, USA) solution and fixed in 3.7% paraformaldehyde (PFM, Sigma, P-6148, St. Louis, MO, USA) for 15 minutes. Oocytes were then submitted to an additional 15 minutes exposition into PBS solution plus 2% polyvinyl-pyrrolidone (PVP, Sigma, P-0930, St. Louis, MO, USA)

(RODRIGUES and RODRIGUES, 2003b). Groups of 5 oocytes were placed over a slide, stained with 2  $\mu$ L of Hoechst (Sigma, 33342, St Louis, MO, USA) solution in glycerol (10ug/ml) (Sigma, G-5516, St. Louis, MO, USA, 10 $\mu$ g/ml), and overlaid with a cover slip supported by four small pieces of baton glue, sealed with clear nail polish for fluorescent microscopy analysis of the nuclear maturation stage. Nuclear morphology was classified as germinal vesicle (GV), germinal vesicle breakdown (GVBD), metaphase/anaphase I (MI/AI), metaphase II (MII), unidentified or degenerated chromatin (others).

### STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis was performed using software SPSS, version 13.0. Data were analyzed using Chi-squared analysis with adjusted residual. Fisher's exact test was used for comparison of nuclear maturation in oocytes. The values were considered statistically significant when  $P < 0.05$ . Experiment 1 was done in five replicates. Experiment 2 was replicated nine times.

### RESULTS

In treatment 1, 326 selected oocytes were obtained from 9 bitches. There were no significant differences in oocytes that reached the MII stage at 72 hours for control, 10 and 50 $\mu$ M groups respectively (5/108, 4.6%; 4/115, 3.5%; 6/103, 5.8%), when comparison was established among maturation media ( $P = 0.844$ ) (Table 1).

**Table 1. The *in vitro* maturation rates of canine oocytes exposed to 10 or 50 $\mu$ M  $\alpha$ -tocopherol.**

Treatment	N	GV n (%)	GVBD n (%)	MI/AI n (%)	MII n (%)	Others n (%)
Control	108	29 (26.9)	21 (19.4)	24 (22.2)	5 (4.6)	29 (26.9)
10 $\mu$ M $\alpha$ -tocopherol	115	31 (27.0)	31 (27.0)	22(19,1)	4 (3.5)	27 (23.4)
50 $\mu$ M $\alpha$ -tocopherol	103	22 (21.4)	28 (27.2)	24 (23.3)	6 (5.8)	23 (22.3)

GV: Germinal vesicle; GVBD: Germinal vesicle breakdown; MI/AI: Metaphase/Anaphase I; MII: Metaphase II; others: unidentified or degenerated chromatin.

In treatment 2, 314 selected oocytes were obtained from 10 bitches. Resumption of meiosis (GVBD + MI + MII) was 31.9% (31/97), 34.9% (39/112) and 51.5%

(54/105) for control, 100 and 500 $\mu$ M groups, respectively. Results showed that number of oocytes that resumed meiosis was significantly higher in oocytes matured in TCM-199 supplemented with 500 $\mu$ M  $\alpha$ -tocopherol ( $P = 0.005$ ; Table 3). Progression of nuclear maturation to the metaphase I/metaphase II (MI/MII) stages was 17.5% (17/97), 16.1% (18/112) and 22.9% (24/105) for control, 100 and 500 $\mu$ M groups, respectively. A significantly higher proportion of oocytes matured in medium supplemented with 500 $\mu$ M  $\alpha$ -tocopherol achieved the MI-MII stages ( $P = 0.014$ ). Oocytes cultured with 500 $\mu$ M of  $\alpha$ -tocopherol had a lower percentage ( $P = 0.036$ ) of retained germinal vesicle (GV) at the end of culture (17.1%), compared to the control (39.2%) and 100 $\mu$ M (33.9%).

**Table 2. The *in vitro* maturation rates of canine oocytes exposed to 100 or 500 $\mu$ M  $\alpha$ -tocopherol**

Treatment	N	GV n (%)	GVBD n (%)	MI/AI n (%)	MII n (%)	Others n (%)
Control	97	38 (39.2) <sup>a</sup>	14 (14.4) <sup>c</sup>	16 (16.5) <sup>g</sup>	1 (1.0)	28 (28.9)
100 $\mu$ M $\alpha$ -tocopherol	112	38 (33.9) <sup>b</sup>	21 (18.7) <sup>c</sup>	17(15.2) <sup>g</sup>	1 (0.9)	35 (31.3)
500 $\mu$ M $\alpha$ -tocopherol	105	18 (17.1) <sup>c</sup>	30 (28.6) <sup>d</sup>	23 (21.9) <sup>f</sup>	1 (1.0)	33 (31.4)

GV, Germinal vesicle; GVBD, Germinal vesicle breakdown; MI/AI, Metaphase/Anaphase I; MII, Metaphase II; others, unidentified or degenerated chromatin.

Values with different superscripts in the same column (<sup>abc, de, fg</sup>) differ significantly (Chi-square analysis with adjusted residual) ( $P = 0.036$ ).

## DISCUSSION

The present study was undertaken to determine the nuclear maturation rates of canine oocytes cultured in TCM-199 medium supplemented with  $\alpha$ -tocopherol. Our results demonstrate that  $\alpha$ -tocopherol at high concentrations positively influences meiosis resumption of dog oocytes. However, this influence was not sufficient to enhance the rates of MI to MII achievement.

Alpha-tocopherol is the predominant lipid-soluble antioxidant in animal cells, protects cells from oxygen radicals *in vivo* (CHOW, 1979) and *in vitro*, is thought to be the primary free radical scavenger in mammalian cells membranes (CHOW, 1991). Alpha-tocopherol protects polyunsaturated fatty acids in cell membranes, avoids peroxidation of these membranes, inhibits structural damage responsible for affecting function and permeability of membranes, what results in irreversible cell injury and

death (OLSON e SEIDEL, 2000). As canine oocytes contain large amounts of lipid yolk material (GURAYA, 1965), they might be more susceptible to lipid peroxidation. As lipid peroxidation occurs as a chain reaction, the reaction expands to surrounding phospholipids (TAPPEL, 1980); therefore,  $\alpha$ -tocopherol could stop this chain reaction, providing better culture conditions for canine oocytes.

Similar to data reported by Dalvit *et al.* (2005), where  $\alpha$ -tocopherol an/or ascorbic acid added to maturation medium failed to augment the percentage of bovine oocyte meiotic maturation, the results of experiment 1 indicate that TCM-199 medium supplemented with low concentration of  $\alpha$ -tocopherol (10 and 50 $\mu$ M) is not enough to increase the rates of nuclear maturation in canine oocytes. Likewise, Takami *et al.* (1999) found that neither alpha-tocopherol nor ascorbic acid affected nuclear maturation in rats, as opposed by several artificial antioxidants that not only affected nuclear maturation but also produced a decrease in meiosis resumption. These observations suggest that the natural antioxidant  $\alpha$ -tocopherol at low concentrations exerts no effect on *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes.

In experiment 2, oocytes were exposed to 100 or 500 $\mu$ M  $\alpha$ -tocopherol in medium. These concentrations were 10 times higher than those used in the experiment 1. In previous studies, concentrations of  $\alpha$ -tocopherol used as antioxidants on *in vitro* maturation and embryo production in other species like the pig varied from 50 $\mu$ M to 800 $\mu$ M (WANG *et al.*, 2002, KITAGAWA *et al.*, 2004). Kitagawa *et al.* (2004) reported that 100 $\mu$ M  $\alpha$ -tocopherol has embryotrophic properties on porcine IVF derived embryos. Nevertheless, Wang *et al.* (2002) emphasized that 400 $\mu$ M  $\alpha$ -tocopherol or higher concentrations induced a dose-dependent decrease in blastocyst development and blastocyst cell numbers in *in vitro* culture medium. Also, Tao *et al.* (2004) demonstrated that concentrations equals to 200 $\mu$ M  $\alpha$ -tocopherol caused significantly higher DNA fragmentation of cumulus cells and 100 $\mu$ M  $\alpha$ -tocopherol significantly increased the percentage of atypical pig oocytes. These data are in accordance to those reported by Jeong *et al.* (2006), who found that concentrations of  $\alpha$ -tocopherol greater than 100 $\mu$ M were responsible for lowering blastocyst production in IVF and somatic cell nuclear transfer (SCNT) of porcine embryos. Intriguingly, our results showed that 500 $\mu$ M  $\alpha$ -tocopherol in TCM-199 had a positive influence on meiosis resumption of canine COCs, when oocytes were exposed to this antioxidant concentration. Unlike to what has been observed for other species, high  $\alpha$ -tocopherol concentration cannot be considered toxic for dog oocytes in *in vitro* conditions. However, one factor to be considered is that

$\alpha$ -tocopherol may act as a pro-oxidant in high concentrations after a certain period and that it has an antioxidant action for a short period of time, then rapidly reacting with oxidant species and forming free radicals (SEN *et al.*, 2006). This might explain, in part, why this concentration failed in provides the final steps of IVM in our experiment.

Although the results showed a positive influence for meiosis resumption in the presence of 500 $\mu$ M, this amount of  $\alpha$ -tocopherol failed to facilitate the final steps of IVM of dog oocytes, and to achieve MII stage.

According Tao *et al.* (2004), suitable levels of  $\alpha$ -tocopherol could to some extent mimic the function of cumulus cells, and improve the development of porcine denuded oocytes from the MI to the MII stage. But unfortunately, this effect was not observed in COCs in the same experiment. Cumulus cells coupled to porcine oocytes protect them from oxidative stress by augmenting the intracellular glutathione (GSH) (TATEMOTO *et al.*, 2000). As a major non-proteinous sulphhydryl compound, GSH plays an important role in protecting mammalian cells against oxidative damage (MEISTER and TATE, 1976). In canids, cumulus cells remain attached to the oocyte even after fertilization till the morula stage (RENTON *et al.*, 1991). It has been shown that, the presence of cumulus cells is necessary for the majority of oocytes to express its meiotic competence (SIRARD *et al.*, 1988), being responsible for triggering the meiosis of dog oocytes submitted to IVM (FARSTAD, 2000; SRSEN *et al.*, 1998). As antioxidant,  $\alpha$ -tocopherol might enhance the level of GSH of porcine denuded oocytes, but it cannot improve further development of cumulus enclosed oocytes (TAO *et al.*, 2004). Similar to what was observed in porcine oocytes, the presence of cumulus cells in canine oocytes could be implicated in our results of the second experiment, where even increasing concentrations of  $\alpha$ -tocopherol, it was not enough to improve the development of canine oocytes from MI to the MII stage.

Kitagawa *et al.* (2004) observed that culture of oocytes under 20% O<sub>2</sub> resulted in a high hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) concentration and low developmental competence of porcine IVF embryos, demonstrating a relationship between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content and oocyte developmental rate. Nevertheless, a decrease in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content was observed in the same study when  $\alpha$ -tocopherol was included in medium. Alpha-tocopherol prevented DNA fragmentation under 20% O<sub>2</sub> (KITAGAWA *et al.*, 2004). Tao *et al.* (2004) showed that cumulus cells exposed to  $\alpha$ -tocopherol, at any level, can be protected from deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation. Previous studies reported about the effects of  $\alpha$ -tocopherol in preventing follicular cell apoptosis, indicating the protective function

of  $\alpha$ -tocopherol on *in vitro* maturation (TILLY and TILLY, 1995, TARIN *et al.*, 1998a). Therefore, under high oxygen atmosphere, similar to the oxygen conditions imposed to the oocytes in our study,  $\alpha$ -tocopherol diminishes lipid peroxidation and DNA damage generated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (AGARWAL *et al.*, 2008).

The type of substance used for dilution of  $\alpha$ -tocopherol (ethanol 95%), was based in satisfactory results obtained in *in vitro* culture of embryos in different species (OLSON and SEIDEL, 2000; TSUJII *et al.*, 2002; TAO *et al.*, 2004). According Lima-Verde, (2006), who found no improvement of follicular viability by  $\alpha$ -tocopherol supplementation, the type of substances as well as their concentrations and the presence of others antioxidants in the culture medium could cause damage to the cells what is in accordance with our results.

To the best of our knowledge, this is the first experiment evaluating the addition of  $\alpha$ -tocopherol to the IVM medium to enhancing IVM of canine oocytes. It is known that requirements for IVM of dog oocytes differ markedly from most domestic species studied to date. Identifying these unique traits is essential for successfully mature dog oocytes and to produce viable embryos.

In conclusion, the tested supplementations of  $\alpha$ -tocopherol in IVM medium did not affect IVM rates of canine oocytes. Further research is needed to evaluate the appropriate level or necessity of antioxidants on canine IVM.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank FAVET/UFRGS, Centro de Zoonoses and The Veterinary Clinic Veterinária do Vale for generously providing the bitches ovaries and the grant support received from CNPQ National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ), Brazil.

## REFERENCES

AGARWAL, A. *et al.* Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.3, n.28, p.1-21, 2005.

AGARWAL, A. *et al.* Redox Considerations in Female Reproductive Function and Assisted Reproduction: From Molecular Mechanisms to Health Implications. **Antioxidants and Redox Signaling**, v.19, n.8, p.1375-1403, 2008.



- BOGLIOLO, L. *et al.* Influence of co-culture with oviductal epithelial cells on *in vitro* maturation of canine oocytes. **Reproduction Nutrition Development**, v.42, p.265-273, 2002.
- BOLAMBA, D. *et al.* *In vitro* maturation of domestic dog oocytes cultured in advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**, v.49, n.5, p.933-942, 1998.
- CHOW, C.K. Nutritional influence on cellular antioxidant defense systems. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.32, n.5, p.1066-1081, 1979.
- CHOW, C.K. Vitamin E and oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v.11, n.2, p.215-232, 1991.
- CHOW, C.K. *et al.* Vitamin E regulates mitochondrial hydrogen peroxide generation. **Free Radical Biology and Medicine**, v.27, n.5-6, p.580-587, 1999.
- DALVIT, G. *et al.* Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte *in vitro* maturation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.40, n.2, p. 93-97, 2005.
- DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v.82, n.1, p.47-95, 2002.
- FARSTAD, W. Assisted reproductive technology in canid species. **Theriogenology**, v.53, n.1, p.175-186, 2000.
- FUJII, M. *et al.* The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.62, n.3, p.305-307, 2000.
- GUERIN, P. *et al.* Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v.7, n.2, p.175-189, 2001.
- GURAYA, S.S. A histochemical analysis of lipid yolk deposition in the oocytes of cat and dog. **Journal of Experimental Zoology**, v.160, n.1, p.123-135, 1965.
- HEWITT, D.A. *et al.* Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. **Theriogenology**, v.49, p.1083-1101, 1998.
- HEWITT, D.A., ENGLAND, G.C. Influence of gonadotrophin supplementation on the *in vitro* maturation of bitch oocytes. **The Veterinary Record**, v.144, n.9, p. 237-239, 1999a.
- HOSSEIN, M.S. *et al.* Temporal effects of alpha-tocopherol and L-ascorbic acid on *in vitro* fertilized porcine embryo development. **Animal Reproduction Science**, v.100, n.1-2, p.107-117, 2007a.
- JEONG, Y.W. *et al.* Antiapoptotic and embryotrophic effects of alpha-tocopherol and L-ascorbic acid on porcine embryos derived from *in vitro* fertilization and somatic cell

nuclear transfer. **Theriogenology**, v.66, n.9, p.2104-2112, 2006.

KIM, M.K., et al. Effects of estradiol-17beta and progesterone supplementation on *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v.63, n.5, p.1342-1353, 2005.

KITAGAWA, Y. *et al.* 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, n.7, p.1186-1197, 2004.

LIEBLER, D.C. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 23, n.2, p.147-169, 1993.

LIMA-VERDE, I.B. **Utilização de substâncias antioxidantes ( $\alpha$ -tocoferol e ternatina) no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos.** 82f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2006.

LUVONI, G.C. *et al.* Meiosis resumption of canine oocytes cultured in the isolated oviduct. **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, n.5, p.410-414, 2003.

McEVOY, T.G. *et al.* Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.118, n.1, p.163-170, 2000.

MEISTER, A., TATE, S.S. Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. **Annual Review of Biochemistry**. v.45, p.559-604, 1976.

OLSON, S.E., SEIDEL, G.E. Culture of *in vitro*-produced bovine embryos with vitamin E improves development *in vitro* and after transfer to recipients. **Biology of Reproduction**, v.62, n.2, p. 248-252, 2000.

RENTON, J.P. *et al.* Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v.93, n.1, p.221-231, 1991.

RODRIGUES, B.A., RODRIGUES, J.L. Meiotic response of *in vitro* matured canine oocytes under different proteins and heterologous hormone supplementation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, n.1, p.58-62, 2003b.

SAINT-DIZIER, M. *et al.* *In vitro* maturation of bitch oocytes: effect of sperm penetration. **Journal of Reproduction and Fertility - Supplement**, v.57, p.147-150, 2001.

SEN, C.K. *et al.* Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. **Life Science**, v.78, n.18, p.2088-2098, 2006.

SIRARD, M.A. *et al.* The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. **Biology of Reproduction**, v.39, n.3, p.546-552, 1988.

SONGSASEN, N. *et al.* Nuclear maturation of canine oocytes cultured in protein-free

media. **Molecular Reproduction and Development**, v.62, n.3, p. 407-415, 2002.

SRSEN, V. *et al.* Effects of follicle-stimulating hormone, bovine somatotrophin and okadaic acid on cumulus expansion and nuclear maturation of blue fox (*Alopex lagopus*) oocytes in vitro. **Zygote**, v.6, n.4, p.299-309, 1998.

STURNEY, R.G., LEESE, H. J. Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. **Reproduction**, v.126, n.2, p.197-204, 2003.

TAKAMI, M. *et al.* Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous resumption of meiosis. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v.276, n.4, p.E684-688, 1999.

TAO, Y. *et al.* Exposure to L-ascorbic acid or alpha-tocopherol facilitates the development of porcine denuded oocytes from metaphase I to metaphase II and prevents cumulus cells from fragmentation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.39, n.1, p.52-57, 2004.

TAPPEL, A.L. Vitamin E and selenium protection from *in vivo* lipid peroxidation. **Annals of New York Academy of Science**, v.355, p.18-31, 1980.

TARIN, J.J. *et al.* Antioxidants may protect against infertility. **Human Reproduction**, v.13, n.6, p.1415-1416, 1998a.

TATEMOTO, H. *et al.* Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during *In vitro* maturation: role of cumulus cells. **Biology of Reproduction**, v.63, n.3, p.805-10, 2000.

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

TSUJII, H. *et al.* Culture of *in vitro* mouse embryos with vitamin E improves development. **Journal of Reproduction and Development**, v.48, n.1, p.25-29, 2002.

WANG, X., *et al.* Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility and Sterility**, v.78, n.6, p.1272-1277, 2002.

YAMADA, S., *et al.* *In vitro* maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.47, p.227-229, 1993.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

As biotécnicas aplicadas à reprodução animal têm contribuído para a pesquisa e produção animal, ajudando a elucidar as funções fisiológicas, melhorar os índices de produtividade das diferentes espécies animais e a multiplicar animais em vias de extinção. Neste sentido, os caninos domésticos desempenham papel fundamental no desenvolvimento e aprimoramento de técnicas que visem a preservação do germoplasma, principalmente no que se refere aos canídeos em extinção.

A espécie canina é única no que se diz respeito à maturação oocitária e aos eventos pré e pós-ovulatórios. Além disso, a baixa competência meiótica dos oócitos caninos quando submetidos às condições *in vitro*, associada ao elevado estresse oxidativo que esses oócitos são submetidos, se reflete em resultados pouco expressivos de maturação nuclear obtidos até o presente momento. Dessa forma, o aprimoramento dos meios de cultura e das técnicas de cultivo *in vitro* desses oócitos é de importância para a melhoria dos resultados e consequentemente o desenvolvimento embrionário *in vitro* nessa espécie.

A utilização de antioxidantes na maturação e fecundação *in vitro* já é bem difundida em outras espécies. Apesar dos compostos reativos ao oxigênio estarem implicados na mobilização de grande quantidade de glutatona, peroxidação lipídica das membranas, dano celular e apoptose, estes também funcionam como moléculas sinalizadoras, sendo necessários para o correto desenvolvimento embrionário. Dessa forma, o equilíbrio entre antioxidantes e radicais livres no meio deve ser preservado. Poucos experimentos avaliaram os efeitos dos antioxidantes na MIV canina, e apenas alguns obtiveram êxito.

No presente estudo, demonstramos que os oócitos caninos podem ser maturados *in vitro* em meio TCM-199 suplementado com cisteína ou  $\alpha$ -tocopherol. Entretanto, o efeito protetor esperado pelas propriedades antioxidantes desses compostos, não pôde ser observada, não havendo aumento nas taxas de maturação *in vitro*.

A suplementação de cisteína no meio de maturação *in vitro* de oócitos caninos como fonte antioxidante é controversa. Apesar de termos utilizado condições de maturação *in vitro* semelhantes a estudos realizados anteriormente, nossos resultados ficaram aquém do esperado. A falta de competência meiótica dos oócitos utilizados pode ter sido responsável pelos resultados baixos e pouco expressivos, mas outros fatores

devem também ser investigados, tais como a tensão de oxigênio a qual os oócitos são submetidos e a interação com outros componentes do meio.

Por outro lado, a utilização do  $\alpha$ -tocoferol como antioxidante na MIV canina é inovadora. Em nosso experimento, quando suplementado em doses altas (100 e 500 $\mu$ M), este não mostrou ser tóxico aos oócitos caninos, proporcionando aumento nas taxas de retomada de meiose, mas este estímulo não se manteve até o estágio de MII. Pode-se inferir que, a ação antioxidante do  $\alpha$ -tocoferol só é benéfica e necessária no início do processo de maturação.

Em suma, torna-se necessário a realização de futuros experimentos, testando a associação de diferentes antioxidantes em diferentes concentrações, e momentos diferentes de suplementação, na tentativa de se aumentar às taxas de MIV de oócitos caninos.

## REFERÊNCIAS

- ABEYDEERA, L.R. *et al.* Presence of  $\beta$ -mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocyst development after *in vitro* fertilization. **Theriogenology**, v.50, p.747-756, 1998.
- AGARWAL, A. *et al.* Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.3, n.28, p.1-21, 2005.
- AGARWAL, A. *et al.* Redox Considerations in Female Reproductive Function and Assisted Reproduction: From Molecular Mechanisms to Health Implications. **Antioxidants and Redox Signaling**, v.10, n.8, p.1375-1403, 2008.
- ALI, A.A. *et al.* Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, v.59, p.939-949, 2003.
- ALVAREZ, J.G., STOREY, B.T. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v.42, n.3, p.334-346, 1995.
- ARÉCHIGA, C.F. *et al.* Efficacy of vitamin E and glutathione for thermoprotection of murine morulae. **Theriogenology**, v.41, n.8, p.1545-1553, 1994.
- BAKA, S., MALAMITSI-PUCHNER, A. Novel follicular fluid factors influencing oocyte developmental potential in IVF: a review. **Reproductive Biomedicine Online**, v.12, n.4, p.500-506, 2006.
- BALASUBRAMANIAN, S., RHO, G.J. Effect of cysteamine supplementation of *in vitro* matured bovine oocytes on chilling sensitivity and development of embryos. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.282-292, 2007.
- BANNAI, S. Transport of cystine and cysteine in mammalian cells. **Biochimica et Biophysica Acta – Review on Biomembranes**, v.779, p.289–306, 1984.
- BAVISTER B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Human Reproduction Update**, v.1, n.2, p.91-148, 1995.
- BIELSKI, B.H. *et al.* A study of the reactivity of HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>- with unsaturated fatty acids. **The Journal of Biological Chemistry**, v.258, n.8, p.4759-4761, 1983.
- BING, Y.Z. *et al.* Effects of cysteamine, FSH and estradio-17 $\beta$  on *in vitro* maturation of porcine oocytes. **Theriogenology**, v.55, n.4, p.867-876, 2001.
- BOGLIOLO, L. *et al.* Influence of co-culture with oviductal epithelial cells on *in vitro* maturation of canine oocytes. **Reproduction Nutrition Development**, v.42, p.265-273, 2002.
- BOLAMBA, D. *et al.* *In vitro* maturation of domestic dog oocytes cultured in advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**, v.49, n.5, p.933-942, 1998.

BYERS, A.P. *et al.* Mature domestic cat oocyte does not express a cortical granule-free domain. **Biology of Reproduction**, v.47, n.5, p.709-715, 1992.

CHEN, N. *et al.* Influence of cysteamine supplementation and culture in portable dry-incubator on the *in vitro* maturation, fertilization and subsequent development of mouse oocytes. **Theriogenology**, v.63, p.2300-2310, 2005.

CHOU, A.C. *et al.* Abnormalities of iron metabolism and erythropoiesis in vitamin E-deficient rabbits. **Blood**, v.52, n.1, p.187-195, 1978.

CHOW, C.K., TAPPEL, A.L. An enzymatic protective mechanism against lipid peroxidation damage to lungs of ozone-exposed rats. **Lipids**, v.7, n.8, p.518-524, 1972.

CHOW, C.K. *et al.* Effect of dietary vitamin E on the activities of the glutathione peroxidase system in rat tissues. **Journal of Nutrition**, v.103, n.4, p.618-624, 1973.

CHOW, C.K. Nutritional influence on cellular antioxidant defense systems. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.32, n.5, p.1066-1081, 1979.

CHOW, C.K. Vitamin E and oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v.11, n.2, p.215-232, 1991.

CHOW, C.K. *et al.* Vitamin E regulates mitochondrial hydrogen peroxide generation. **Free Radical Biology and Medicine**, v.27, n.5-6, p.580-587, 1999.

CHOW, C.K. Vitamin E regulation of mitochondrial superoxide generation. **Biological Signals and Receptors**, v.10, n.1, p.112-124, 2001.

CHOW, C.K. Biological functions and metabolic fate of vitamin E revisited. **Journal of Biomedical Science**, v.11, n.3, p.295-302, 2004.

CONCANNON, P. W. *et al.* Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. v.39, p.3-25, 1989.

COSTA, S.H.F. *et al.* *In vitro* culture of ovine primordial follicles in media supplemented with coconut water. **Animal Reproduction**, v.3, n.4, p.403-409, 2006.

DALVIT, G. *et al.* Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte *in vitro* maturation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.40, n.2, p.93-97, 2005.

DE LOS REYES, M. *et al.* Effect of human chorionic gonadotrophin supplementation during different culture periods on *in vitro* maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v.64, p.1-11, 2005.

DE LOS REYES, M. *et al.* Evaluation of cortical granules and viability of canine oocytes during long-term *in vitro* maturation. **The Veterinary Record**, v.160, n.6, p.196-198, 2007.

DE LOS REYES, M. *et al.* Ultrastructural study of the canine zona pellucida surface

during *in vitro* maturation. **Proceedings of the 6<sup>th</sup> ISCFR (International Symposium on Canine and Feline Reproduction) & 6<sup>th</sup> Biannual EVSSAR Congress.** (eds G. England, P. Concannon, S. Schäfer-Somi), p.71-72. Vienna, Austria, 2008.

DE MATOS, D.G. *et al.* Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1420–1425, 1997.

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

DERUSSI, A.A.P *et al.* Caracterização da zona pelúcida em embriões caninos através da coloração com ácido periódico de schiff (PAS). **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, supl.3, s.1038, 2007. (Abstract)

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v.82, n.1, p.47-95, 2002.

EPPIG, J.J. *et al.* Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. **Developmental Biology**, v.164, n.1, p.1-9, 1994.

EVANS, H.M., BISHOP, K.S. On the Existence of a Hitherto Unrecognized Dietary Factor Essential for Reproduction. **Science**, v.56, n.1458, p.650-651, 1922.

EVANS, H.M. Invariable Occurrence of Male Sterility with Dietaries Lacking Fat Soluble Vitamin E. **The Proceedings of the National Academy of Sciences Online**, v.11, n.7, p.373-377, 1925.

EVANS, H.M., BURR, G.O. The Anti-Sterility Vitamin Fat Soluble E. **The Proceedings of the National Academy of Sciences Online**, v.11, n.6, p.334-341, 1925.

FARSTAD, W. Assisted reproductive technology in canid species. **Theriogenology**, v.53, n.1, p.175-186, 2000.

FRAGA, C.G., OTEIZA, P.I. Iron toxicity and antioxidant nutrients. **Toxicology**, v.180, n.1, p.23-32, 2002.

FUJII, M. *et al.* The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.62, n.3, p.305-307, 2000.

FUNAHASHI, H. Effect of  $\beta$ -mercaptoethanol during *in vitro* fertilization procedures on sperm penetration into porcine oocytes and the early development *in vitro*. **Reproduction**, v.130, n.6, p.889-898, 2005.

GASPARRINI, B. *et al.* Effect of cysteamine during *in vitro* maturation on buffalo embryo development. **Theriogenology**, v.54, p.1537-1542, 2000.

GASPARRINI, B. *et al.* Enrichment of *in vitro* maturation medium for buffalo (bubalus



bubalis) oocytes with thiol compounds: effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. **Theriogenology**, v.65, p.275-287, 2006.

GUÉRIN, P. *et al.* Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v.7, n.2, p.175-189, 2001.

GURAYA, S.S. A histochemical analysis of lipid yolk deposition in the oocytes of cat and dog. **Journal of Experimental Zoology**, v.160, n.1, p.123-135, 1965.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 2ed, Clarendon Press, Oxford, p.22-85, 1989.

HEWITT, D.A., ENGLAND, G.C. The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation *in vitro*. **Theriogenology**, v.49, n.5, p.957-966, 1998.

HEWITT, D.A. *et al.* Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. **Theriogenology**, v.49, p.1083-1101, 1998.

HEWITT, D.A., ENGLAND, G.C. Influence of gonadotrophin supplementation on the *in vitro* maturation of bitch oocytes. **The Veterinary Record**, v.144, n.9, p.237-239, 1999a.

HEWITT, D.A., ENGLAND, G.C. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.55, n.1, p.63-75, 1999b.

HOLST, P.A., PHEMISTER, R.D. The prenatal development of the dog: preimplantation events. **Biology of Reproduction**, v.5, n.2, p.194-206, 1971.

HOSSEIN, M.S. *et al.* Temporal effects of alpha-tocopherol and L-ascorbic acid on *in vitro* fertilized porcine embryo development. **Animal Reproduction Science**, v.100, n.1-2, p.107-117, 2007a.

HOSSEIN, M.S. *et al.* Effects of thiol compounds on *in vitro* maturation of canine oocytes collected from different reproductive stages. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p.1213-1220, 2007b.

IMAI, H., NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v.34, n.2, p.145-169, 2003.

IZADYAR, F. *et al.* *In vitro* maturation of bovine oocyte in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v.45, p.372-377, 1996.

JEONG, Y.W. *et al.* Antiapoptotic and embryotrophic effects of alpha-tocopherol and L-ascorbic acid on porcine embryos derived from *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. **Theriogenology**, v.66, n.9, p.2104-2112, 2006.

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

KA, H.H. *et al.* Amino acids in maturation medium and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matures and penetrated *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1478-1483, 1997.

KIM, M.K. *et al.* Effect of  $\beta$ -mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on *in vitro* maturation of canine oocytes from dogs with different stages of the estrus cycle. **Journal of Veterinary Science**, v.5, n.3, p.253-258, 2004.

KIM, M.K. *et al.* Effects of estradiol-17 $\beta$  and progesterone supplementation on *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v.63, p.1342-1353, 2005.

KIM, M.K. *et al.* Glutathione content of *in vivo* matured canine oocytes collected from different reproductive stages. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.69, n.6, p.627-632, 2007.

KISHIDA, R. *et al.* *In vitro* maturation of porcine oocytes using a defined medium and developmental capacity after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology**, v.62, n.9, p.1663-1676, 2004.

KITAGAWA, Y. *et al.* 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, n.7, p.1186-1197, 2004.

LEE, H.S. *et al.* Effect of follicle stimulation hormone and luteinizing hormone on cumulus cell expansion and *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, n.6, p.561-565, 2007a.

LEE, S.R. *et al.* Effect of conditioned medium of mouse embryonic fibroblasts produced from EC-SOD transgenic mice in nuclear maturation of canine oocytes *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.99, n.1-2, p.106-116, 2007b.

LIEBLER, D.C. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. **Critical Reviews in Toxicology**, v.23, n.2, p.147-169, 1993.

LIMA-VERDE, I.B. **Utilização de substâncias antioxidantes ( $\alpha$ -tocoferol e ternatina) no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos**. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2006.

LINH, N.V. *et al.* Effects on cysteine in IVM media on *in vitro* maturation under low oxygen tension, *in vitro* fertilization, and *in vitro* culture of porcine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v.20, n.1, p.203, 2007. (abstract)

LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reproductive Biology**, v.5, n.1, p.5-17, 2005.

LUVONI, G.C. *et al.* Improvement in bovine embryo production *in vitro* by

glutathione-containing culture media. **Molecular Reproduction and Development**, v.43, n.4, p.437-443, 1996.

LUVONI, G.C. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: *in vitro* embryo production. **Reproduction Nutrition Development**, v.40, n.5, p.505-512, 2000.

LUVONI, G.C. *et al.* Influence of different stages of the oestrous cycle on cumulus-oocyte communications in canine oocytes: effects on the efficiency of *in vitro* maturation. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement, v.57, p.141-146, 2001.

LUVONI, G.C. *et al.* Meiosis resumption of canine oocytes cultured in the isolated oviduct. **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, n.5, p.410-414, 2003.

LUVONI, G.C. *et al.* Factors involved *in vivo* and *in vitro* maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v.63, p.41-59, 2005.

LUVONI, G.C., CHIGIONI, S. Culture strategies for maturation of carnivore oocytes. **Theriogenology**, v.66, p.1471-1475, 2006.

LUVONI, *et al.* Effect of gonadotropins during *in vitro* maturation of feline oocytes on oocyte-cumulus cells functional coupling and intracellular concentration of glutathione. **Animal Reproduction Science**, v.96, n.1-2, p.66-78, 2006.

MAHI, C.A., YANAGIMACHI, R. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. **Journal of Experimental Zoology**, v.196, n.2, p.189-196, 1976.

MARINHO, A.P.S. *et al.* Estimativa da população de folículos ovarianos pré-antrais em cadelas e gatas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, Supl.3, s.1067, 2007.

MARTINS, F.S. *et al.* Development of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian tissue in Minimal Essential Medium supplemented with coconut water. **Animal Reproduction**, v.2, n.2, p.106-113, 2005.

MAYOR, P. *et al.* Effects of the addition of glutathione during maturation on *in vitro* fertilization of prepubertal goat oocytes. **Zygote**, v.9, p.323-330, 2001.

McEVOY, T.G. *et al.* Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.118, n.1, p.163-170, 2000.

MEISTER, A., TATE, S.S. Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. **Annual Review of Biochemistry**, v.45, p.559-604, 1976.

MEISTER, A. Selective modification of glutathione metabolism. **Science**, v.220, n.4596, p.472-477, 1983.

MEISTER, A., ANDERSON, M.A. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v.52, p.711-760, 1983.

NASR-ESFAHANI, M. *et al.* The effect of iron and iron chelators on the *in vitro* block to development of the mouse preimplantation embryo: BAT6 a new medium for improved culture of mouse embryos *in vitro*. **Human Reproduction**, v.5, n.8, p.997-1003, 1990a.

NASR-ESFAHANI, M.H. *et al.* Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed *in vitro* or *in vivo*. **Development**, v.109, n.2, p.501-507, 1990b.

NASR-ESFAHANI, M.M., JOHNSON, M.H. The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured *in vitro*. **Development**, v.113, n.2, p.551-560, 1991.

NASR-ESFAHANI, M.H. *et al.* Effects of glucose, glutamine, ethylenediaminetetraacetic acid and oxygen tension on the concentration of reactive oxygen species and on development of the mouse preimplantation embryo *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.96, n.1, p.219-231, 1992.

OLSON, S.E., SEIDEL, G.E. Culture of *in vitro* produced bovine embryos with vitamin E improves development *in vitro* and after transfer to recipients. **Biology of Reproduction**, v.62, n.2, p. 248-252, 2000.

OTOI, T. *et al.* Effect of serum on the *in vitro* maturation of canine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v.1, p.387-390, 1999.

OTOI, *et al.* Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. **Theriogenology**, v.54, n.4, p.535-542, 2000.

OTOI, T. *et al.* Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. **Reproduction**, v.124, n.6, p.775-781, 2002.

OYAMADA, T., FUKUI, Y. Oxygen tension and medium supplements for *in vitro* maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. **Journal of Reproduction and Development**, v.50, n.1, p.107-117, 2004.

OYAWOYE, O. *et al.* Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. **Human Reproduction**, v.18, n.11, p.2270-2274, 2003.

PIRES, E.A. **Efeito da suplementação de CIS e cisteamina sobre a maturação nuclear de oócitos de fêmeas caninas (*Canis familiaris*) obtidos por ováriosalpingo-histerctomia durante a fase pré-ovulatória do estro.** 66 p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2006.

RAUSSEL, F., TARIN, J.J. Función del glutatión educido durante la maduración y fecundación de ovocitos desarrollo pre-implantatorio de embriones *in vitro* en mamíferos. **Revista Iberoamericana de Fertilidad**, v.22, n.6, p.414-429, 2005.

RENTON, J.P. *et al.* Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.93, n.1, p.221-231, 1991.

REYNAUD, K. *et al.* *In vivo* meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. **Reproduction**, n.130, v.2, p.193-201, 2005.

RODRIGUES, B.A., RODRIGUES, J.L. Influence of reproductive status on *in vitro* oocyte maturation. **Theriogenology**, v.60, p.59-66, 2003a.

RODRIGUES, B.A., RODRIGUES, J.L. Meiotic response of *in vitro* matured canine oocytes under different proteins and heterologous hormone supplementation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, n.1, p.58-62, 2003b.

RODRIGUES, B.A. *et al.* Embryonic development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized dog oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.67, n.2, p. 215-223, 2004.

RODRIGUES, B.A. *et al.* The effect of hyaluronan concentrations in hST-supplemented TCM 199 on *in vitro* nuclear maturation of bitch cumulus-oocyte complexes. **Theriogenology**, v.66, n.6-7, p.1673-1676, 2006.

RODRIGUES, B.A. *et al.* Effect of maturation medium on *in vitro* cleavage of canine oocytes fertilized with fresh and cooled homologous semen. **Zygote**, v.15, p.43-53, 2007.

RODRIGUES, B.A. *et al.* Preliminary study in immature canine oocytes stained with brilliant cresyl blue (BCB) and obtained from bitches with low and high progesterone serum profiles. **Proceedings of the 6<sup>th</sup> ISCFR (International Symposium on Canine and Feline Reproduction) & 6<sup>th</sup> Biannual EVSSAR Congress**. (eds G. England, P.Concannon, S. Schäfer-Somi), p.199-200. Vienna, Austria, 2008.

RODRIGUEZ, P. *et al.* Cumulus cells viability and the relationship with nuclear morphology in oocytes from pre-pubertal and adult bitches at 0, 24, 48 and 72 hours after *in vitro* maturation. **Proceedings of the 6<sup>th</sup> ISCFR (International Symposium on Canine and Feline Reproduction) & 6<sup>th</sup> Biannual EVSSAR Congress**. (eds G. England, P.Concannon, S. Schäfer-Somi), p.201-202. Vienna, Austria, 2008.

ROSE, R.C., BODE, A.M. Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. **Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.7, n.12, p.1135-1142, 1993.

SAWAI, K. *et al.* Stage-specific requirement of cysteine during *in vitro* maturation of porcine oocytes for glutathione synthesis associated with male pronuclear formation. **Biology of Reproduction**, v.57, n.1, p.1-6, 1997.

SAINT-DIZIER, M. *et al.* *In vitro* maturation of bitch oocytes: effect of sperm penetration. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement, v.57, p.147-150, 2001.

SAINT-DIZIER, M. *et al.* Chromatin, microtubules, and kinases activities during meiotic resumption in bitch oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.68, n.2, p.205-212, 2004.

SANTOS, L.C. *et al.* *In vitro* nuclear maturation of bitch oocytes in the presence of polyvinyl-pyrrolidone. **Animal Reproduction**, v.3, n.1, p.70-75, 2006.

SEN, C.K. *et al.* Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. **Life Science**, v.78, n.18, p.2088-2098, 2006.

SILVA *et al.* The influence of oxygen tension on cumulus cell viability of canine COCs matured in high-glucose medium. **Proceedings of the 6<sup>th</sup> ISCFR (International Symposium on Canine and Feline Reproduction) & 6<sup>th</sup> Biannual EVSSAR Congress**. (eds G. England, P. Concannon, S. Schäfer-Somi), p.226-228. Vienna, Austria, 2008.

SIRARD, M.A. *et al.* The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. **Biology of Reproduction**, v.39, n.3, p.546-552, 1988.

SIRARD, M.A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v.55, n.6, p.1241-1254, 2001.

SONG, K., LEE, E. Modification of maturation condition improves oocytes maturation and *in vitro* development of somatic cell nuclear transfer pig embryos. **The Journal of Veterinary Science**, v.8, n.1, p.81-87, 2007.

SONGSASEN, N. *et al.* Effects of maturation media and oxygen concentration on nuclear maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v.55, n.1, p.494, 2001.

SONGSASEN, N. *et al.* Nuclear maturation of canine oocytes cultured in protein-free media. **Molecular Reproduction and Development**, v.62, n.3, p.407-415, 2002.

SONGSASEN, N., WILDT, D.E. Size of the donor follicle, but not stage of reproductive cycle or seasonality, influences meiotic competency of selected domestic dog oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.72, n.1, p.113-119, 2005.

SRSEN, V. *et al.* Effects of follicle-stimulating hormone, bovine somatotrophin and okadaic acid on cumulus expansion and nuclear maturation of blue fox (*Alopex lagopus*) oocytes *in vitro*. **Zygote**, v.6, n.4, p.299-309, 1998.

STEELE, C.E. *et al.* The effect of vitamin E and synthetic antioxidants on the growth *in vitro* of explanted rat embryos. **The Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, n.1, p.115-123, 1974.

STURNEY, R.G., LEESE, H. J. Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. **Reproduction**, v.126, n.2, p.197-204, 2003.

TAKAMI, M. *et al.* Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous resumption of meiosis. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v.276, n.4, p.E684-688, 1999.

TAO, Y. *et al.* Exposure to L-ascorbic acid or alpha-tocopherol facilitates the development of porcine denuded oocytes from metaphase I to metaphase II and prevents

cumulus cells from fragmentation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.39, n.1, p.52-57, 2004.

TAPPEL, A.L. Vitamin E and selenium protection from *in vivo* lipid peroxidation. **Annals of New York Academy of Science**, v.355, p.18-31, 1980.

TARIN, J.J. *et al.* Antioxidants may protect against infertility. **Human Reproduction**, v.13, n.6, p.1415-1416, 1998a.

TARIN, J.J. *et al.* Antioxidant therapy counteracts the disturbing effects of diamide and maternal ageing on meiotic division and chromosomal segregation in mouse oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v.4, n.3, p.281-288, 1998b.

TARIN, J.J. *et al.* Oral antioxidants counteract the negative effects of female aging on oocyte quantity and quality in the mouse. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, n.3, p.385-397, 2002a.

TARIN, J.J. *et al.* Effect of dietary supplementation with a mixture of Vitamins C and E on fertilization of tertiary butyl hydroperoxide-treated oocytes and parthenogenetic activation in the mouse. **Theriogenology**, v.57, n.2, p.869-881, 2002b.

TARIN, J.J. *et al.* Oral administration of pharmacological doses of vitamins C and E reduces reproductive fitness and impairs the ovarian and uterine functions of female mice. **Theriogenology**, v.57, n.5, p.1539-1550, 2002c.

TATEMOTO, H. *et al.* Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of cumulus cells. **Biology of Reproduction**, v.63, n.3, p.805-810, 2000.

TATEMOTO, H. *et al.* 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 of Reproduction**, v.71, n.4, p.1150-1157, 2004.

TESORIERO, J.V. Early ultrastructural changes of developing oocytes in the dog. **Journal of Morphology**, v.168, n.2, p.171-179, 1981.

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

TSUJII, H. *et al.* Culture of *in vitro* mouse embryos with vitamin E improves development. **Journal of Reproduction and Development**, v.48, n.1, p.25-29, 2002.

TSUTSUI, T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement, v.39, p.269-275, 1989.

URSINI, F. *et al.* The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.839, n.1, p.62-70, 1985.

VANNUCCHI, C.I. *et al.* *In vitro* canine oocyte nuclear maturation in homologous

oviductal cell co-culture with hormone supplemented media. **Theriogenology**, v.66, p.1677-1681, 2006.

VAN SOOM, A. *et al.* Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. **Theriogenology**, v.57, p.1453-1465, 2002.

WANG, W.H. *et al.* Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. **Biology of Reproduction**, v.56, n.6, p.1376-1382, 1997.

WANG, W.H., DAY, B.N. Development of porcine embryos produced by IVM/IVF in a medium with or without protein supplementation: effects of extracellular glutathione. **Zygote**, v.10, n.2, p.109-115, 2002.

WANG, X., *et al.* Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility and Sterility**, v.78, n.6, p.1272-1277, 2002.

WESSEL, G.M. *et al.* The biology of cortical granules. **International Review of Cytology**, v.209, p.117-206, 2001.

WHITAKER, B.D., KNIGHT, J.W. Exogenous  $\alpha$ -glutamyl cycle compounds supplemented to *in vitro* fertilization, culture, and viability parameters of porcine oocytes and embryos. **Theriogenology**, v.62, p.311-322, 2004.

WHITTINGHAN, D.G. Culture of mouse ova. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.48, n.14, p.7-21, 1971.

WILLINGHAM-ROCKY *et al.* Effects of stage of oestrous cycle and progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes *in vitro*. **Reproduction**, v.126, n.4, p.501-508, 2003.

YAMADA, S. *et al.* *In vitro* maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility, Supplement**, v.47, p. 227-229, 1993.

YAMAMOTO, K., NIKI, E. Interaction of alpha-tocopherol with iron: antioxidant and prooxidant effects of alpha-tocopherol in the oxidation of lipids in aqueous dispersions in the presence of iron. **Biochimica et Biophysica Acta – Lipid and Lipid Metabolism**, v.958, n.1, p.19-23, 1988.

YAMAUCHI, N., NAGAI, T. Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after *in vitro* maturation in the presence of cysteamine. **Biology of Reproduction**, v.61, p.828-833, 1999.

YOSHIDA, M. *et al.* Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. **Biology of Reproduction**, v.49, p.89-94, 1993.





**MATURAÇÃO DE OVÓCITOS CANINOS/COLORAÇÃO****COLORAÇÃO:****TEMPERATURA:**

	<b>MEIO</b>	<b>MEIO</b>	<b>MEIO</b>
<b>VG</b>			
<b>VGBD</b>			
<b>MI</b>			
<b>AI</b>			
<b>MII</b>			
<b>OUTROS</b>			
<b>DEGENERADOS</b>			
<b>TOTAL</b>			

**OBSERVAÇÕES:**

## ANEXO B – PROTOCOLO PARA DILUIÇÃO E CONFECCÃO DAS ALÍQUOTAS DE $\alpha$ -TOCOFEROL

$\alpha$ -tocopherol (Vitamina E), Sigma T3126

Peso molecular: 530,78 g/mol

Mol (M); grama (g); litro (L); miligrama (mg); mililitro (mL); microlitro ( $\mu$ L)

Para efeito de cálculo, temos:

$$\begin{aligned}
 1 \text{ M} &= 530,78 \text{ g/L} \\
 1 \text{ M} &= 530,78 \text{ mg/mL} \\
 1 \mu\text{M} &= 0,0000010 \text{ M} \\
 10 \mu\text{M} &= 0,0000100 \text{ M} \\
 10 \mu\text{M} &= 0,0000100 \times 530,78 \text{ mg/mL} \\
 10 \mu\text{M} &= 0,0053078 \text{ mg/mL}
 \end{aligned}$$

**Tabela 1.** Concentração de  $\alpha$ -tocopherol no meio de MIV.

Concentração	$\alpha$ -Tocopherol (mg/mL)
10 $\mu$ M	0,00530780
50 $\mu$ M	0,02653900
100 $\mu$ M	0,05307800
500 $\mu$ M	0,26539000

A concentração de ethanol a ser utilizada no meio de maturação é de 0,05%, visto que o ethanol nesta concentração não possui efeito deletério no desenvolvimento embrionário (OLSON e SEIDEL, 2000). Desta forma, para um volume de 2,0 mL ou 2.000  $\mu$ L de meio de MIV, a quantidade de ethanol a ser adicionada deverá ser 1  $\mu$ L (2.000  $\mu$ L x 0,05% = 1 $\mu$ L).

Note que as quantidades expressas na Tabela 1 são para 1 mL de meio, devendo-se então fazer o ajuste das quantidades para 2 mL (Tabela 2).

**Tabela 2.** Quantidade de  $\alpha$ -tocopherol em função da concentração desejada no meio de MIV e do volume de etanol para efeitos de diluição (**ajustado p/ 2 mL de meio MIV**).

Concentração de $\alpha$ -tocopherol (MIV)	Quantidade de $\alpha$ -tocopherol por volume de ethanol		
	1 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
10 $\mu$ M	0,01061560 mg	1,06156000 mg	0.001062 g
50 $\mu$ M	0,05307800 mg	5,30780000 mg	0.005308 g

---

100 $\mu$ M	0,10615600 mg	10,61560000 mg	0.010616 g
500 $\mu$ M	0,53078000 mg	53,07800000 mg	0.053078 g

---

Para a obtenção da concentração desejada em 2 mL meio MIV, diluir a quantidade indicada de  $\alpha$ -tocopherol em 100 $\mu$ L de ethanol conforme Tabela 2. Confeccionar alíquotas de 1 $\mu$ L e identificá-las de acordo com a concentração de  $\alpha$ -tocopherol correspondente. Usar 1 alíquota para cada 2 mL de meio MIV.

### Referências

OLSON, S.E., SEIDEL, G.E. Culture of *in vitro* produced bovine embryos with vitamin E improves development *in vitro* and after transfer to recipients. **Biology of Reproduction**, v.62, n.2, p. 248-252, 2000.