

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Adição de paraoxonase-1 durante a maturação oocitária e seu efeito sobre a
produção *in vitro* de embriões bovinos**

Joao Alveiro Alvarado Rincón

Pelotas, 2015

Joao Alveiro Alvarado Rincón

Adição de paraoxonase-1 durante a maturação oocitária e seu efeito sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal)

Orientador: Augusto Schneider

Coorientadora: Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

R111a Rincon, Joao Alveiro Alvarado

Adição de paraoxonase-1 durante a maturação oocitária e seu efeito sobre a produção in vitro de embriões bovinos / Joao Alveiro Alvarado Rincon ; Augusto Schneider, orientador ; Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro, coorientadora. — Pelotas, 2015.

41 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Antioxidante. 2. Bovino. 3. Expressão gênica. I. Schneider, Augusto, orient. II. Pegoraro, Lígia Margareth Cantarelli, coorient. III. Título.

CDD : 636.211

Joao Alveiro Alvarado Rincón

Adição de paraoxonase-1 durante a maturação oocitária e seu efeito sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 12 de Fevereiro de 2015.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Augusto Schneider (orientador).
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Bernardo Garziera Gasperin.
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria.

Prof. Dr. Arnaldo Diniz Vieira.
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prof. Dr. Rafael Gianella Mondadori.
Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade de Brasília.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, ao meu pai Hernando, minha mãe Claudia e ao meu irmão Felipe, por serem meus guias e socorro presente na hora das dificuldades.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço ao Augusto Schneider, pela orientação, paciência e amizade durante todo o experimento, excelente pesquisador e ser humano.

Agradeço à Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro pelo apoio, paciência, amizade e orientação quando foi necessário.

Agradeço à Universidade Federal de Pelotas e à EMBRAPA Clima Temperado, por disponibilizar a estrutura física e humana, parte essencial no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), pelo exemplo de trabalho em equipe, pela ajuda e apoio científico, de muita importância na execução deste trabalho.

Agradeço aos colegas e amigos, pela palavra de apoio nos momentos difíceis, meu muito obrigado pela ajuda prestada nas mais diversas atividades, sem as quais nada disto seria possível.

Resumo

RINCÓN, Joao Alveiro Alvarado. **Adição de paraoxonase-1 durante a maturação oocitária e seu efeito sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos**. 2015. 41f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Estudos sugerem que a enzima paraoxonase-1 (PON1) pode exercer efeito antioxidante nas membranas celulares, o que poderia melhorar a competência do oócito, principalmente por reduzir o estresse oxidativo. Baseado nisso, objetivou-se avaliar o efeito da adição de diferentes níveis de PON1 recombinante humana (rPON1) ao meio de maturação (MIV), sobre os índices de desenvolvimento embrionário e expressão gênica em oócitos e embriões bovinos. Em 8 repetições, 1600 *complexos cumulus oócitos* (COCs) foram coletados de ovários bovinos provenientes de abatedouros locais e divididos aleatoriamente em quatro grupos de 50 COCs: 0,0; 0,02; 0,04 e 0,08mg/mL de rPON1 no meio de MIV. A maturação ocorreu em estufa com 5% de CO₂ e 39 °C durante 24 horas. Após a seleção espermática, com a utilização do mini percoll®, foi procedida a fecundação (FIV) com concentração de 1x10⁶ espermatozóides/mL. Decorridas 18 horas os prováveis zigotos foram cultivados durante 7 dias no meio de cultivo adicionado de 10% de SFB em condições controladas (5% CO₂, 5% O₂ e 90%N₂) à 39 °C. Foram coletados oócitos desnudos e células do *cumulus* (600 COCs, 3 repetições) e embriões D7 (8 repetições) para extração de RNA e análise da expressão gênica (Bax, Bcl-2 e MnSOD). A atividade de PON1 foi avaliada às 0 e 24hs de maturação mediante espectrofotometria. A atividade média de PON1 no meio de MIV foi de 2,15±0,38; 15,51±1,48; 30,24±2,96 e 57,94±5,03 U/mL de acordo à adição de rPON1 ao meio de MIV (0; 0,02; 0,04 e 0,08 mg/mL respectivamente). Não houve diferença (P>0,05) nas taxas de clivagem: 81,7%, 85,1%, 81,0%, 82,5% respectivamente. No entanto, a adição de rPON1 no meio de MIV melhorou o desenvolvimento embrionário de maneira linear (P<0,0001) de acordo com a quantidade de proteína adicionada, resultando na produção de embriões em D7 de 22,1%; 29,2%; 31,7% e 33,8% respectivamente. Além disso, este efeito foi suportado pela correlação positiva entre o nível de rPON1 no meio de MIV e a taxa de blastocisto no D7 (r=0,35; P=0,04). Não foi observada diferença na expressão dos genes avaliados nos oócitos, células do *cumulus* e embriões. Conclui-se que a adição de rPON1 no meio de MIV tem um efeito positivo na PIV de embriões bovinos, indicando que a PON1 promove uma melhor taxa de desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: antioxidante; bovino; expressão gênica

Abstract

RINCÓN, Joao Alveiro Alvarado. **Effects of the addition of paraoxonase-1 during oocyte maturation on the *in vitro* production of bovine embryos**. 2015. 41f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Some studies suggest that the enzyme paraoxonase-1 (PON1) can exert antioxidant effects on cell membranes, thereby improving the competence of the oocyte, particularly by reducing oxidative stress. Based on this, the aim of the current study was to evaluate the effect of different levels of human recombinant PON1 (rPON1) in the maturation medium, on embryo development and gene expression in bovine oocytes and embryos. The study was performed in 8 repetitions, using 1600 *cumulus* oocyte complexes (COCs) collected from bovine ovaries at local slaughterhouses and divided randomly into four groups of 50 COCs each containing 0.0; 0.02; 0.04 and 0.08 mg/mL rPON1 in the IVM medium. Maturation occurred in the incubator at 5% CO₂ and 39 °C for 24 hours. After the sperm selection using the mini Percoll®, IVF was performed with a sperm concentration of 1x10⁶/ml. After 18 hours, presumptive zygotes were cultured for 7 days using IVC medium with the addition of 10% FBS under controlled conditions (5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂) at 39°C. In addition, denuded oocytes and *cumulus* cells (600 COCs, 3 repetitions) and D7 embryos (8 repetitions) were collected for RNA extraction and gene expression analysis (Bax, Bcl-2 and MnSOD). PON1 activity was evaluated at 0 and 24 hours of maturation by spectrophotometry. The average PON1 activity in the IVM medium was 2.15±0.38; 15.51±1.48; 30.24±2.96 and 57.94±5.03 U/mL according to the addition of 0.0; 0.02; 0.04 and 0.08 mg/mL of rPON1 in the IVM medium. There was no difference (P>0.05) in cleavage rates among treatments: 81.7%; 85.1%; 81.0%. 82.5% respectively. However, the addition of rPON1 to the IVM medium improved embryo development linearly (P<0.0001), resulting in D7 embryo production of 22.1%, 29.2%, 31.7% and 33.8%, respectively. Moreover, this effect was supported by the positive correlation between the level rPON1 in the IVM medium and the D7 blastocyst rate (r=0.35; P=0.04). There was no difference in gene expression in oocytes, cumulus cells and embryos. Finally, the addition of rPON1 in the IVM medium had a positive effect on the IVP of bovine embryos, indicating that PON1 improves embryo rate.

Keywords: antioxidant; bovine; gene expression

Lista de figuras

Figura 1 -	Atividade enzimática de PON1 no meio de MIV de acordo com o nível de adição da proteína recombinante.....	25
Figura 2 -	Produção in vitro de embriões bovinos no D7 de acordo com o nível de PON1 recombinante no meio de MIV.....	26

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Sequência específica de primers utilizados para Real Time PCR (GYU-JIN et al., 2007).....	24
Tabela 2 - Produção média de embriões por estágio de desenvolvimento.....	26
Tabela 3 - Expressão relativa dos genes Bax, Bcl-2 e MnSOD.....	27

Sumário

1 Introdução.....	10
2 Revisão de literatura	14
2.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	14
2.2 Maturação oocitária.....	15
2.3 Estresse oxidativo.....	16
2.4 Paraoxonase-1.....	18
3 Metodologia	20
3.1 Produção de embriões.....	20
3.2 Amostras para análise da atividade de PON1 e de expressão gênica	21
3.3 Análise da atividade de PON1	22
3.4 Análise de expressão gênica	22
3.5 Análise estatística	24
4 Resultados	25
5 Discussão	28
6 Conclusões	31
Referências.....	32

1 Introdução

A paraoxonase-1 (PON1) é uma enzima sintetizada no fígado e liberada na corrente sanguínea, onde encontra-se ligada exclusivamente à lipoproteína de alta densidade (HDL) (DRAGANOV et al., 2000). A PON1 desempenha um papel fundamental na capacidade anti-inflamatória e antiaterogênica do HDL, protegendo o HDL, as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as células e os lipídeos de danos oxidativos e peroxidativos (DRAGANOV et al., 2000; 2005). Na população humana atividade reduzida de PON1 está associada a inúmeros eventos fisiopatológicos como aterosclerose, diabetes, câncer, distúrbios neurológicos (KORDI-TAMANDANI et al., 2011; LAWLOR et al., 2007; PRÉCOURT et al., 2011) e cardiovasculares (DURRINGTON et al., 2001), entre outros. Vários fatores modulam a atividade sérica da PON1 em humanos, dentre eles podemos citar polimorfismos genéticos, ingestão de ácidos graxos, ingestão de colesterol, ingestão de álcool e fumo, sendo que a maior contribuição observada (15% da variação total) se deve a um polimorfismo presente na região promotora do gene da PON1 (KIM et al., 2013).

Em bovinos, a PON1 tem sido caracterizada principalmente como uma proteína de fase aguda, reduzindo seus níveis circulantes em resposta às citocinas liberadas durante a inflamação (BIONAZ et al., 2007). Por tanto, a resposta eficiente aos processos inflamatórios e a recuperação dos animais doentes está atrelada ao restabelecimento dos níveis normais de PON1 após o período de estresse (BOSSAERT et al., 2012). Alguns estudos sugerem, que a PON1 pode desempenhar um papel importante na susceptibilidade a várias doenças e deficiências imunológicas quando seus níveis apresentam-se muito baixos (PEZZULO et al., 2012), assim como a importância da PON1 na detecção precoce de doenças do periparto como mastite e metrite em vacas leiteiras (KRAUSE et al., 2014; SCHNEIDER; CORREA e BUTLER, 2013), sendo às vezes, utilizada como indicador de função hepática durante processos inflamatórios (CERON, TECLES e TVARIJONAVICIUTE, 2014).

A PON1 tem a capacidade de prevenir o aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), hidrolisar os peróxidos lipídicos, diminuir a susceptibilidade do HDL à peroxidação e aumentar o efluxo do colesterol a partir de macrófagos (DURRINGTON et al., 2001). Devido à permeabilidade da membrana basal do folículo ovariano, o HDL é a única lipoproteína presente no fluido folicular (JASPARD et al., 1996), apresentando uma correlação positiva entre os níveis séricos e intrafoliculares. Da mesma maneira, a PON1 é transferida do soro ao fluido folicular em bovinos (SCHNEIDER et al., 2013) e em humanos (BROWNE et al., 2008), sugerindo que sua transferência a partir do sangue ocorre junto com o HDL, visto que estão correlacionados nos dois compartimentos (BROWNE et al., 2008; SCHNEIDER et al., 2013). Desta maneira, alterações nos níveis sanguíneos de PON1 alteram consequentemente sua atividade no fluido folicular, podendo afetar a qualidade do oócito e a fertilidade. Schneider et al. (2013) encontraram atividade de PON1 de 82,6 U/ml e 53,9 U/mL ($P=0.01$) em folículos estrogênio ativos e folículos atrésicos respectivamente, indicando variações nos níveis de PON1 conforme à atividade folicular. Em mulheres submetidas a processo de fecundação *in vitro* (FIV) a maior atividade sérica e intrafolicular de PON1 e maior concentração de apolipoproteína A tipo I (ApoAI) estão relacionadas a melhor qualidade embrionária e com maior número de blastômeros (BROWNE et al., 2008), indicando que o HDL e principalmente a PON1 podem desempenhar um papel de proteção na saúde do oócito e no desenvolvimento embrionário inicial (FUJIMOTO et al., 2010).

A atividade ovariana normal resulta na produção de EROs, envolvidas em processos fisiológicos como a maturação oocitária, esteroidogênese e nas funções do corpo lúteo (AGARWAL; GUPT e SHARMA, 2005). A geração excessiva de EROs e/ou diminuição da capacidade antioxidante é denominada estresse oxidativo (ANDRADE et al., 2010). Tanto em condições *in vitro* quanto *in vivo*, somente oócitos competentes podem retomar a meiose, adquirir a habilidade de serem fertilizados, se desenvolver até o estágio de blastocisto e ter capacidade de induzir uma gestação (CARREL et al., 2005; FARIN et al., 2007). Para se tornar competente, o oócito precisa passar gradualmente por mudanças que incluem um remodelamento físico e molecular (FAIR et al., 1996). No entanto, o estresse oxidativo e as condições de cultivo *in vitro* (CIV) podem promover profundos efeitos na competência genética dos oócitos maturados *in vitro* (CARREL et al., 2005). Desta maneira, torna-se

interessante a pesquisa de possíveis agentes antioxidantes para melhora da fertilidade tanto para condições *in vivo* como *in vitro*.

Apesar dos recentes avanços biotecnológicos, a eficiência da produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE) ainda é considerada baixa (LONERGAN e FAIR, 2014). Fatores como a qualidade oocitária, sistemas de maturação oocitária e CIV são determinantes para o êxito da técnica (KITAGAWA, et al., 2004). Considerando que somente 25-40% dos oócitos submetidos à maturação *in vitro* (MIV) são competentes para o desenvolvimento até o estágio de blastocisto (FARIN et al., 2007), pode-se sugerir que a maturação ainda é um dos problemas na PIVE. *In vitro*, a produção de EROs é favorecida pela alta tensão de oxigênio associada à interferência de luz, temperatura, presença de espermatozoides e ausência de antioxidantes naturalmente presentes no fluido folicular (WANG, et al., 2002). Portanto, o estresse oxidativo na MIV consiste numa das principais causas da baixa eficiência da maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário em várias espécies (AGARWAL; GUPTA e SHARMA, 2005).

Um dos efeitos citotóxicos mais importantes decorrentes do estresse oxidativo é a peroxidação lipídica, definida como a deteriorização oxidativa dos ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), resultando em alterações celulares irreversíveis (LIMA e ABDALLA, 2001). Dentre os componentes celulares, as membranas são mais susceptíveis à peroxidação lipídica, devido à grande quantidade de AGPI, acarretando sua destruição ou alterando sua permeabilidade. Em consequência, há perda da seletividade para entrada e saída de substâncias da célula, liberação do conteúdo das organelas, formação de produtos citotóxicos, alteração do DNA, culminando em apoptose ou morte celular (HERSHKO, 1989; MELLO, et al., 1983; WANG et al., 2002). Evidências indicam que a peroxidação lipídica é uma das principais causas da baixa eficiência da maturação oocitária e cultivo embrionário *in vitro*, principalmente por induzir o bloqueio do desenvolvimento e comprometimento da qualidade oocitária e embrionária (NASR-ESFAHANI, AITKEN e JOHNSON, 1990; WANG et al., 2002).

Estudos *in vivo* sugerem que a ação da PON1 está relacionada com sua capacidade antioxidante nas membranas celulares, o que pode melhorar a competência do oócito, principalmente por reduzir o estresse oxidativo, dentre diversos outros fatores presentes no fluido folicular (BROWNE et al., 2008). Baseado no exposto anteriormente é possível relacionar o estresse oxidativo e o fator protetor da PON1 à qualidade do oócito e ao desenvolvimento embrionário inicial. Neste

sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de diferentes níveis de PON1 ao meio de maturação, sobre os índices de desenvolvimento embrionário e expressão gênica em oócitos e embriões bovinos.

2 Revisão de literatura

2.1 Produção in vitro de embriões

A PIVE é uma biotécnica eficiente na produção de animais de alto valor genético, tornando-se uma importante ferramenta na exploração do potencial reprodutivo dos rebanhos, aumentando o número de descendentes, diminuindo o intervalo entre gerações e aumentando a velocidade do melhoramento (ANDRADE et al., 2002; VARAGO; MENDONÇA e LAGARES, 2008). Além disso, esta biotécnica é base para outras biotecnologias como a transferência nuclear e transgenia (MERTON et al., 2003).

A PIVE surgiu na década de 80 do século passado, com o nascimento do primeiro bezerro a partir de um oócito fecundado e cultivado *in vitro* e, seguidamente transferido para o oviduto de uma receptora (BRACKETT et al., 1982). Desde então, todos os processos envolvidos na PIVE vem sendo estudados, esclarecidos e, em consequência detalhados. Após amplas pesquisas em biotecnologia, o Brasil passou por um crescimento significativo na última década, chegando a dominar biotécnicas como a aspiração folicular e a PIVE (SENEDA et al., 2002), tornando-se o maior produtor de embriões do mundo (IBGE, 2011; SBTE, 2012).

Apesar disso, a eficiência da PIVE ainda está longe de ser ideal. Em bovinos, 90% dos oócitos recuperados e submetidos à MIV atingem a fase de metáfase II, aproximadamente 80% são fecundados e somente 30 a 40% conseguem-se desenvolver até a fase de blastocisto (LONERGAN e FAIR, 2014). Um dos pontos determinantes para o sucesso da PIVE é o fator materno (conteúdo citoplasmático do oócito como proteínas e RNAm) que é fundamental para que os oócitos suportem a fecundação e desenvolvimento embrionário (LI e ALBERTINI, 2013). Durante o processo de crescimento até a aquisição de competência para o reinício da meiose, o oócito sofre diversas mudanças bioquímicas, estruturais e citoesqueléticas importantes (BERTAGNOLLI et al., 2004), assim como modificação de estruturas e finalização da síntese de RNA, determinantes para o desenvolvimento futuro (LI e ALBERTINI, 2013).

Assim, o ambiente folicular no qual os oócitos foram mantidos antes da recuperação afeta diretamente sua capacidade de desenvolvimento *in vitro* (ARLOTTO et al., 1996; CAMARGO et al., 2006). Concomitantemente Peixoto et al. (2002) mencionam que a resposta das doadoras aos tratamentos de superovulação, aspiração folicular e subsequente PIVE têm resultados variáveis tanto na qualidade dos oócitos, quanto na produção de embriões viáveis, enquanto Seneda et al. (2001) afirmam que a boa qualidade dos oócitos é requisito no sucesso destes programas reprodutivos. A atividade metabólica normal em folículos ovarianos pode resultar em estresse oxidativo e danos aos oócitos (AGARWAL; GUPTA e SHARMA, 2005), além disso, condições como o balanço energético negativo (LUCY, 2008), estresse térmico (MOORE et al., 2005) e dietas ricas em proteína e energia (BOLAND et al., 2001) entre outros, podem alterar a qualidade oocitária e subsequente produção de embriões viáveis.

2.2 Maturação oocitária

A maturação oocitária consiste em uma série de transformações nucleares e citoplasmáticas que tornam ao oócito competente (COMBELLES, 2002), capaz de retomar a meiose, adquirir a habilidade de ser fertilizado, se desenvolver até o estágio de blastocisto e ter capacidade de induzir uma gestação (CARREL et al., 2005; FARIN et al., 2007). Quando *in vivo* os oócitos permanecem em estágio inicial da divisão meiótica (vesícula germinativa - VG) até o pico pré-ovulatório de gonadotrofinas (RICHARD e SIRARD, 1996), o que estimula a maturação do oócito e induz a alterações fisiológicas na atividade das células do *cumulus* (FAIR, 2003; RODRIGUEZ E FARIN, 2004). Em cultivo *in vitro*, os *complexos cumulus oócito* (COCs) isolados em meio simples de cultivo retomam a meiose espontaneamente, mesmo na completa ausência de hormônios (PINCUS e ENZMANN, 1935), provavelmente pela simples remoção de algum fator inibitório presente no folículo íntegro. O oócito recomeça o ciclo celular a partir da fase de diplóteno da prófase I, passa pelos estádios de metáfase I, anáfase I, telófase I (término da primeira divisão meiótica) e progride até o estágio de metáfase da segunda divisão meiótica (MEINECKE et al., 2001). No intervalo que compreende os estádios de prófase I a metáfase II, os cromossomos se condensam e o envelope nuclear é desfeito, marcando o início da maturação nuclear (JONES, 2004; MEINECKE et al., 2001). Na sequência, os cromossomos homólogos

são divididos em dois grupos, sendo que metade do número original de cromossomos permanece no oócito (célula haploide) e a outra metade é incorporada ao primeiro corpúsculo polar. Ao término da primeira divisão meiótica, o citoplasma é dividido assimetricamente (CAN et al., 2003), gerando duas células de tamanhos diferentes: uma pequena chamada de corpúsculo polar e outra maior, o oócito secundário. Após a maturação nuclear, o oócito permanece nesse estágio do ciclo celular até a fecundação (MAYES E SIRARD, 2001). Entretanto, durante a maturação citoplasmática ocorrem alterações metabólicas altamente complexas, que envolvem vários eventos simultâneos, como síntese de proteínas (SIRARD et al., 1998), modificações moleculares (KUBELKA et al., 2000), migração e reorganização de organelas no citoplasma (STOJKOVIC et al., 2001).

A qualidade e a competência do oócito estão intimamente relacionadas à fase de crescimento e saúde do folículo, visto que alterações endócrinas ou metabólicas estão acompanhadas de alterações na composição do fluido folicular, comprometendo a capacidade de desenvolvimento dos oócitos, em virtude que são altamente sensíveis a qualquer distúrbio no seu microambiente (LEROY et al., 2008). *In vitro*, a alta tensão de oxigênio associada à interferência de luz, temperatura, presença de espermatozoides e ausência de antioxidantes naturalmente presentes no fluido folicular favorecem a produção de EROs que diminuem a eficiência da MIV (WANG, et al., 2002). Além disso, a capacidade de fecundação e de desenvolvimento embrionário depende da maturação nuclear e citoplasmática do oócito (FERREIRA et al., 2008). Considerando que somente 25-40% dos oócitos submetidos à MIV são competentes para o desenvolvimento até o estágio de blastocisto (FARIN et al., 2007), pode-se sugerir que a maturação ainda é um dos entraves na PIVE.

2.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como a condição biológica onde ocorre um desequilíbrio entre a formação e remoção de agentes oxidantes no organismo, decorrente da geração excessiva de EROs e/ou diminuição de antioxidantes (ANDRADE et al., 2010). Em processos metabólicos normais como a respiração, atividade das células do sistema imune e no metabolismo energético, há formação de EROs, que em situação fisiológica normal, em baixas concentrações são

responsáveis pelo transporte de elétrons na cadeia respiratória (DOWNLING e SIMMONS, 2009).

As EROs também estão envolvidas em processos fisiológicos como a maturação oocitária, esteroidogênese e nas funções do corpo lúteo (AGARWAL; GUPTA e SHARMA, 2005). Neste sentido, Appasamy et al. (2007) sugerem que a esteroidogênese está relacionada com a atividade enzimática antioxidante e que o oócito dentro do folículo esteja naturalmente exposto a um certo nível de estresse oxidativo. Altas concentrações de estrógeno contribuem no aumento da atividade antioxidante, porém, o estresse oxidativo influencia a produção de hormônios esteroides produzidos pelas células da granulosa, principalmente o estrógeno (APPASAMY et al., 2007). Então, o estresse oxidativo pode contribuir ainda para uma redução da atividade antioxidante, o que dificulta o seu controle. Além disso, fenômenos de peroxidação lipídica parecem estar envolvidos nesse processo, influenciando também a produção de outras glicoproteínas pelas células da granulosa, como a inibina A, inibina B, ativina A e o hormônio antimulleriano, que têm sido estudados como marcadores da resposta ovariana e reserva folicular (APPASAMY et al., 2007).

O estresse oxidativo parece danificar oócitos e embriões por levar a peroxidação dos fosfolipídios da membrana e à alteração de grande parte dos tipos de moléculas celulares, tais como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, incluindo alterações mitocondriais, bloqueio do desenvolvimento embrionário e apoptose (WANG et al., 2002). Os mesmos autores mencionam que oócitos e embriões parecem estar protegidos do estresse oxidativo pela presença de antioxidantes dos fluidos folicular e do oviduto. Porém, quando os oócitos são tirados do seu ambiente natural e inclusos nos sistemas de cultivo *in vitro*, eles perdem a sua defesa natural e, portanto, cuidados especiais como a adição de antioxidantes ao meio de cultivo devem ser tomados para evitar que o estresse oxidativo ocorra e reduza a eficiência da PIVE (De MATOS et al., 2002; WANG et al., 2002). Neste contexto, Livingston et al. (2009) sugeriram a existência de um reservatório de enzimas antioxidantes no oócito, as quais são armazenadas na forma de mRNA, presumivelmente para prevenir o estresse oxidativo e garantir o desenvolvimento futuro até o estágio de blastocisto.

Assim, pode ser concluído que apesar das recentes pesquisas e avanços biotecnológicos, a eficiência da PIVE em bovinos ainda é baixa quando comparada com resultados obtidos *in vivo* (LONERGAN e FAIR, 2014). Fatores como a qualidade

dos oócitos, as condições de maturação oocitária e cultivo de embriões *in vitro* parecem ser determinantes no sucesso destas biotécnicas. *In vitro* as altas tensões de oxigênio associadas à interferência da luz favorecem a produção de EROs, além disso, a presença de espermatozoides e ausência de antioxidantes maternos ajudam no incremento de EROs (WANG et al., 2002). Portanto, estratégias que visem diminuir o estresse oxidativo *in vitro* e *in vivo* podem favorecer o desenvolvimento embrionário inicial.

2.4 Paraoxonase-1

Em mamíferos, a paraoxonase (PON) é uma família multigênica de enzimas composta por três membros PON1, PON2 e PON3 (PRIMO-PARMO et al., 1996). A nomenclatura da PON é atribuída à função original, a hidrólise do paraoxon, porém, estudos recentes demonstraram que também é capaz de hidrolisar outros substratos metabólicos como ésteres aromáticos (fenilacetato) e lactonas aromáticas (COSTA et al., 2003; DRAGANOV e LA DU, 2004), entre outros. A função exata das PONs ainda não foi completamente elucidada, e atualmente é objeto de estudo em diversos campos de pesquisa. A PON2 é exclusivamente intracelular e expressada unicamente em tecidos, enquanto a PON3 é encontrada no soro associada ao HDL, mas em níveis menos abundantes (100 vezes) do que a PON1 (DRAGANOV et al., 2000; NG et al., 2001).

A PON1 é definida como uma esterase cálcio-dependente, sintetizada no fígado e liberada na corrente sanguínea, onde encontra-se ligada exclusivamente ao HDL e desempenha um papel fundamental na capacidade do HDL para proteger o LDL, células e lipídeos de danos oxidativos e peroxidativos (DRAGANOV et al., 2000, 2005). Na população humana a PON1 está associada a inúmeros eventos fisiopatológicos como aterosclerose, diabetes, câncer, distúrbios neurológicos, entre outros (KORDI-TAMANDANI et al., 2011; LAWLOR et al., 2007; PRÉCOURT et al., 2011). Além disso, Schrader e Rimbach (2011) indicam que a atividade sérica de PON1 pode ser influenciada por diversos parâmetros, tais como fatores genéticos, nutricionais, estilo de vida, idade, uso de fármacos, estado de saúde e estresse oxidativo. Da mesma forma, alguns polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) identificados no gene da PON1 demonstram estar associados com os níveis de atividade sérica da enzima (DA COSTA, 2012).

Já em bovinos, a PON1 é caracterizada principalmente como uma proteína de fase aguda negativa, reduzindo seus níveis circulantes em resposta às citocinas liberadas durante o processo inflamatório (BIONAZ et al., 2007). Desta maneira, a resposta eficiente aos processos inflamatórios e a recuperação dos animais doentes está atrelada ao restabelecimento dos níveis normais de PON1 após o período de estresse (BOSSAERT et al., 2012). Já Pezzulo et al. (2012) sugerem que a PON1 pode desempenhar um papel importante na susceptibilidade a várias doenças e deficiências imunológicas quando seus níveis apresentam-se muito baixos. Da mesma forma, a PON1 pode ser usada para a detecção precoce de doenças do periparto como a metrite e endometrite em vacas leiteiras (KRAUSE et al., 2014; SCHNEIDER; CORREA e BUTLER, 2013), sendo às vezes utilizada como indicador de função hepática durante processos inflamatórios (CERON et al., 2014).

Considerando que a PON1 exerce um efeito antioxidante nas membranas celulares e que uma das causas da baixa eficiência da MIV são os efeitos negativos estresse oxidativo gerado em condições de cultivo *in vitro*. A adição de níveis crescentes rPON1 durante a maturação oocitária *in vitro* teria um efeito positivo no subsequente desenvolvimento embrionário.

3 Metodologia

A produção de embriões bovinos *in vitro* foi realizada no Laboratório de Reprodução Animal da EMBRAPA Clima Temperado, as análises da atividade de PON1 foram realizadas no Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Nutrição da UFPel e as análises de expressão gênica foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária, UFPel.

3.1 Produção de embriões

Foram coletados ovários bovinos provenientes de abatedouros locais e transportados ao laboratório em solução salina (NaCl a 0,9 %) suplementada com antibiótico e aquecida à 30 °C. Os *complexos cumulus oócitos* (COCs) foram recuperados mediante a aspiração de folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm com auxílio de escalpes de 18G e bomba a vácuo (10-12 mL/min). Durante a aspiração, o líquido folicular juntamente com os COCs foram mantidos em banho-maria à 30 °C e, posteriormente permaneceram por 10 min para decantação. O sedimento (pellet) foi então transferido para placas de Petri, onde, com ajuda de estereoscópio (40x), foi realizada a recuperação e seleção quanto à qualidade morfológica dos COCs (DE LOOS et al., 1991).

Após a seleção, os COCs foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de 50 conforme a adição de PON1 ao meio de MIV em doses crescentes: 0; 0,02; 0,04 e 0,08 mg/mL de PON1 recombinante humana (rPON1) (Chesapeake PERL Inc., Savage, EUA). Desta maneira foram realizadas 8 repetições totalizando 1600 COCs. Para a maturação foram utilizadas gotas de 400 µL do meio de MIV (Biotecnologia Animal®, Brasília, DF, Brasil) suplementado com rPON1 conforme os tratamentos. A MIV ocorreu em estufa com 5% de CO₂ e 39 °C por 24 horas.

Posterior à maturação, os COCs foram lavados e transferidos para novas gotas de 400 µL do meio de FIV (Biotecnologia Animal®, Brasília, DF, Brasil). Para a

inseminação foram utilizadas palhetas da mesma partida de sêmen *Bos taurus taurus* e após a seleção espermática, com a utilização do mini gradiente de Percoll (Nutricell®, Campinas, SP, Brasil), foi realizada inseminação com concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL. O dia da inseminação foi considerado como o dia 0 (D0) do cultivo. Os oócitos foram incubados com os espermatozoides por 20 horas nas mesmas condições atmosféricas da MIV.

Após o período de fecundação, as estruturas foram transferidas para o meio de manipulação para remoção das células do *cumulus oophorus* mediante pipetagens repetidas. As estruturas recuperadas foram lavadas três vezes e transferidas para gotas de 200 µL do meio de cultivo (Biotecnologia Animal®, Brasília, DF, Brasil) acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Biotecnologia Animal®, Brasília, DF, Brasil) sob óleo mineral (Dow corning® Campinas, SP, Brasil). As placas com os presumíveis zigotos foram acondicionadas em *bags* (5% O₂ e 90% N₂) em estufa 39 °C e 5% de CO₂ durante 7 dias. No dia 3 e 5 foi realizada a troca de 50% do meio de cultivo. A taxa de clivagem (número clivados/números inseminados) foi avaliada 48 horas do início da FIV (D2) e a taxa de desenvolvimento embrionário (número de blastocistos/número de clivados) ao sétimo dia (D7).

3.2 Amostras para análise da atividade de PON1 e de expressão gênica

Para análise da atividade de PON1 foram coletados 15 µL do meio de MIV às 0 e 24 horas de maturação de todos os tratamentos e repetições (n=32). Adicionalmente, no D7 foram coletados em média 10 ± 3 embriões (em estágio de blastocisto inicial, blastocisto ou blastocisto expandido), que foram transferidos para microtubos contendo 100 µL de Quick-Zol (Ludwig Biotec LTDA., Alvorada, RS, Brasil) e homogeneizados em vortex durante 1min.

Para a coleta de oócitos e células do *cumulus*, foram recuperados COCs e submetidos à MIV como descrito anteriormente. Os COCs foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de 50 conforme a adição de rPON1 ao meio de MIV em doses crescentes: 0; 0,02; 0,04 e 0,08 mg/mL de rPON1. Após a maturação, as estruturas foram transferidas a gotas de 200 µL de hialuronidase 0,1% (SIGMA-ALDRICH Inc., Missouri, EUA) e mantidas à 39 °C durante 30min. Após, foi realizada a remoção das células do *cumulus* mediante pipetagens repetidas. Posteriormente, os oócitos desnudos foram transferidos para microtubos contendo 100 µL de Quick-

Zol (Ludwig Biotec LTDA., Alvorada, RS, Brasil) homogeneizados em vortex e armazenados à -70 °C. As gotas de hialuronidase contendo as células do *cumulus* foram centrifugadas em microtubos para precipitação, e após, foram coletados 70 µL do pellet e transferidos a novos microtubos contendo 100 µL de Quick-Zol® homogeneizados em vortex e armazenados à -70 °C. Desta maneira foram realizadas 3 repetições totalizando 600 COCs para análise de expressão gênica.

3.3 Análise da atividade de PON1

Para determinação da atividade PON1 no meio de MIV foi utilizado um protocolo previamente descrito (BROWNE et al., 2007). Brevemente, foi utilizado um tampão Tris/HCl 20 mM, contendo 1 mM de cloreto de cálcio e 4mM de fenilacetato como solução de trabalho. As amostras foram diluídas (1:3) em Tampão 20mM Tris/HCl. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, adicionando-se 3,3 µL da amostra diluída em 500 µL da solução de trabalho. O comprimento de onda utilizado foi de 270 nm e um tempo de leitura de 1 minuto. A atividade da enzima foi determinada pela seguinte fórmula: $\Delta \text{Absorbância} \times 115 \times 3$. A atividade da PON1 foi expressa em U/mL.

3.4 Análise de expressão gênica

A análise de expressão gênica começou com a extração de RNA, as amostras foram descongeladas e homogeneizadas em vortex adicionando 100 µL de Quick-Zol (Ludwig Biotec LTDA., Alvorada, RS, Brasil). Depois disso, foram adicionados 40 µL de clorofórmio e as amostras foram homogeneizadas e incubadas à temperatura ambiente por 3 min. Então, as amostras foram centrifugadas à 4 °C e 12000 g durante 15 min e a fase clara superior (80 µL) transferida para um novo microtubo contendo 160 µL de isopropanol frio. A solução foi então transferida para um sistema de purificação de coluna comercial (RNeasy® Microarray Tissue Mini Kit, QIAGEN® Hilden, NW, Alemanha) e tratada com DNase (RNase-freeDNase Conjunto, QIAGEN®) seguindo as instruções do fabricante. Para finalizar, o RNA foi eluído com 15 µL de água ultrapura e armazenado em microtubos. A transcrição reversa foi realizada com o RNA total extraído (13 µL), utilizando iScript™ Synthesis Kit (BIORAD,

Hercules, CA, EUA) no volume de 20 µL incubados 5min à 25 °C, 30min à 42 °C e 5min à 85 °C (MyCycler™ ThermalCycler, BIO RAD).

Foi realizado o PCR em tempo real usando o corante SYBR Green para avaliar a expressão dos genes de interesse. O gene Histona H2A foi utilizado como controle interno e os genes alvo foram os genes que codificam para as proteínas BCL associada à proteína X (Bax), linfoma de células B-2 (Bcl-2) e Superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD). Segundo Yang (2002) a família de genes BCL, que inclui o Bax (pró-apoptótico) e Bcl-2 (anti-apoptótico) estão envolvidos na regulação da apoptose, neste sentido, o gene Bax é responsável por induzir a enzima caspase-activated-DNase, responsável pela fragmentação do DNA (GYU-JIN, 2007). Em contraste, o mesmo autor menciona que o gene Bcl-2 inibe a apoptose através de diferentes mecanismos, como prevenção da liberação de proteínas mitocondriais, ou seja, a relação entre Bax e Bcl-2, pode determinar se uma célula morre ou vive. Já o gene MnSOD encontra-se associado à atividade mitocondrial, além de possuir papel na diferenciação celular e fornecer uma importante defesa contra dano oxidativo por espécies reativas de oxigênio (LAZZARI, 2011).

As sequências dos iniciadores (primers) estão listadas na Tabela 1. As reações de PCR foram realizadas em duplicata com volume de 20 µL, utilizando 5 µL de SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 0,5 µL de cada iniciador (10 uM), 2 µL do cDNA e 7 µL de água ultrapura. A fluorescência foi quantificada em tempo real no sistema ECO™ Real-Time PCR System (iLLumina®, San Diego, CA, EUA). Para cada ensaio foram corridos 50 ciclos (95 °C durante 3s e 60 °C durante 30s) e uma curva de dissociação foi incluída no final da reação para verificar a amplificação de um único produto de PCR. As análises dos gráficos de amplificação foram realizadas com o software EcoStudy (iLLumina®, San Diego, CA, EUA). Cada placa de ensaio incluiu um controle negativo usando água ultrapura.

O coeficiente de variação foi inferior a 6% para todos os pares de iniciadores utilizados. A expressão relativa foi calculada a partir da equação $2^{A-B}/2^{C-D}$ (em que A é o valor limiar do ciclo [Ct] para o gene de interesse na primeira amostra do controle; B, o valor de Ct para o gene de interesse na amostra analisada; C, o valor de Ct para o gene H2A na primeira amostra do controle e D, o número Ct para o gene H2A na amostra analisada). A primeira amostra do controle foi expressa como 1,00 por esta equação, e todas as outras amostras foram calculadas em relação a este valor. Depois disso, os resultados do grupo controle (adição de rPON1= 0 mg/mL) foram

ponderadas, e todos os outros resultados foram divididos pelo valor médio da expressão relativa no grupo controle, para se obter a mudança na expressão dos genes de interesse em comparação com o grupo de controle (fold change) (MASTERNAK et al., 2005).

Tabela 1- Sequência específica de primers utilizados para Real Time PCR (GYU-JIN et al., 2007).

Genes	Primers
Bcl-2	For- GATGACTTCTCTCGGCGCTAC
	Rev- GTGCCTTCAGAGACAGCCAG
Bax	For- TGCAGAGGATGATCGCAGCTGTG
	Rev- CCAATGTCCAGCCCATCATGGTC
MnSOD	For- CCCATGAAGCCCTTTCTAATCCTG
	Rev- TTCAGAGGCGCTACTATTTCTTC
H2A	For- AGGACGACTAGCCATGGACGTGTG
	Rev- CCACCACCAGCAATTGTAGCCTTG

3.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do procedimento GLM no programa SAS (SAS, Cary, NC, EUA) para o teste do efeito linear, quadrático e cúbico da adição de doses crescentes de rPON1 no meio de MIV sobre a atividade da enzima, taxa de clivagem, produção de embriões no dia 7 e expressão dos genes Bax, Bcl-2 e MnSOD. Além disso, realizou-se o teste de correlação de Pearson entre o nível de atividade de PON1 e a taxa de blastocisto no dia 7 do cultivo embrionário.

4 Resultados

Validando o modelo de estudo, observou-se atividade média de PON1 no meio de MIV de $2,15 \pm 0,38$; $15,51 \pm 1,48$; $30,24 \pm 2,96$ e $57,94 \pm 5,03$ U/mL de acordo à adição de rPON1 ao meio de MIV (0; 0,02; 0,04 e 0,08 mg/mL respectivamente), como se evidencia na figura 1. Desta forma observou-se uma correlação ($r=0,99$; $P<0,001$) positiva entre a quantidade de rPON1 adicionada ao meio de MIV e sua atividade enzimática.

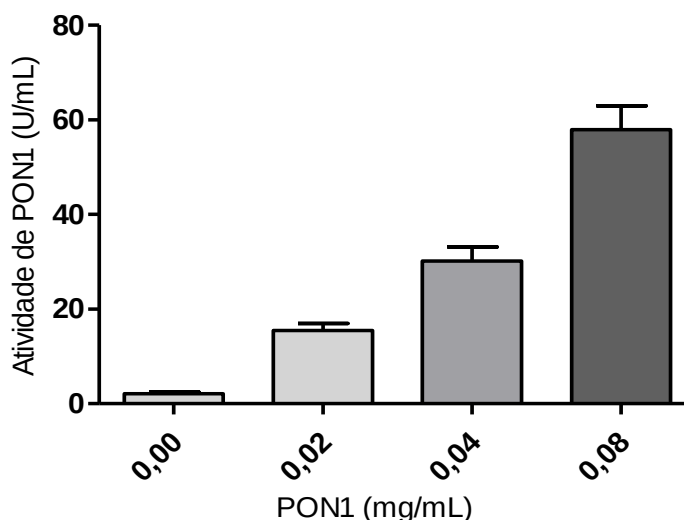


Figura 1- Atividade enzimática de PON1 no meio de MIV de acordo com o nível de adição da proteína recombinante.

As taxas de clivagem no D2 foram de 81,7%; 85,1%; 81,0% e 82,5% para os tratamentos com adição de 0; 0,02; 0,04 e 0,08 mg/mL de PON1 respectivamente, sem diferenças entre tratamentos ($P>0,05$). Porém, a adição de PON1 no meio de MIV melhorou o desenvolvimento embrionário de maneira linear ($P<0,0001$), resultando na produção de embriões em D7 de 22,1%; 29,2%; 31,7% e 33,8% respectivamente, conforme se observa na figura 2. Além disso, este efeito foi suportado pela correlação positiva entre a atividade enzimática da rPON1

adicionada ao meio de MIV e a taxa de blastocistos em D7 ($r=0.35$, $P=0.04$).

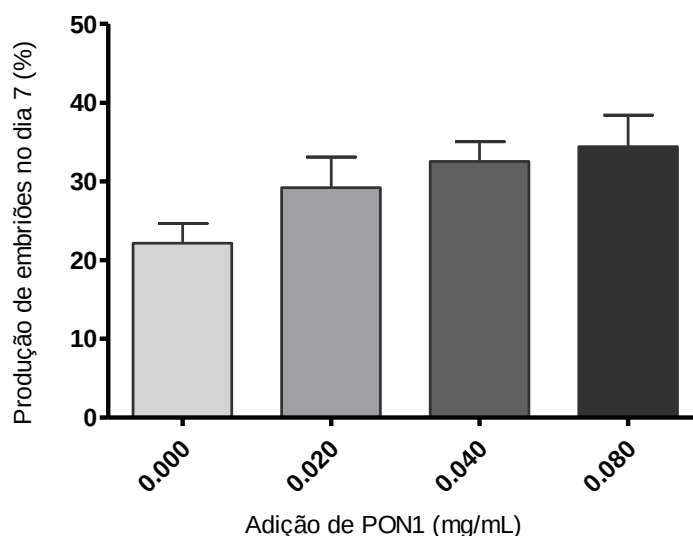


Figura 2- Produção in vitro de embriões bovinos no D7 de acordo com o nível de PON1 recombinante no meio de MIV

A média do número e porcentagem de blastocistos produzidos por tratamento conforme a adição de rPON1 ao meio de MIV no D7 de cultivo são mostrados na tabela 2.

Tabela 2- Produção média de embriões por estágio de desenvolvimento

rPON1 (mg/ μ L)	Oócitos destinados à FIV n	Clivados n (%)	Estádio embrionário n (%)			
			Bi	Bl	Bx	Total
0,00	46,5	38,0 (81,7)	2,3 (6,2)	3,8 (10,1)	2,1 (5,8)	8,3 (22,1)
0,02	43,5	37,1 (85,1)	2,3 (6,7)	4,8 (13,4)	3,5 (9,1)	10,8 (29,2)
0,04	43,5	35,3 (81,0)	2,8 (8,0)	3,5 (9,9)	4,9 (13,8)	11,7 (31,7)
0,08	44,6	36,9 (82,5)	3,3 (9,5)	3,3 (9,3)	5,4 (14,9)	12,5 (33,8)

Bi: Blastocisto inicial; Bl: Blastocisto; Bx: Blastocisto expandido.

Não foi observado efeito da adição de rPON1 sobre a expressão dos genes Bax, Bcl-2 e MnSOD, tanto nas células do *cumulus* e oócitos logo após a MIV, assim como nos embriões no D7 de desenvolvimento (tabela 3).

Tabela 3- Expressão relativa dos genes Bax, Bcl-2 e MnSOD.

rPON1 (mg/ μ L)	Oócitos			Células do <i>Cumulus</i>			Embriões		
	Bax	Bcl-2	MnSOD	Bax	Bcl-2	MnSOD	Bax	Bcl-2	MnSOD
0.00	1,00 $\pm 0,70$	1,00 $\pm 0,04$	1,00 $\pm 0,50$	1,00 $\pm 0,48$	1,00 $\pm 0,33$	1,00 $\pm 1,79$	1,00 $\pm 0,23$	1,00 $\pm 0,48$	1,00 $\pm 0,36$
0.02	0,89 $\pm 0,34$	0,21 $\pm 0,15$	0,44 $\pm 0,30$	0,31 $\pm 0,10$	0,25 $\pm 0,15$	0,18 $\pm 0,09$	2,58 $\pm 0,36$	0,61 $\pm 0,31$	1,15 $\pm 0,45$
0.04	1,42 $\pm 0,24$	0,09 $\pm 0,04$	0,86 $\pm 0,77$	0,34 $\pm 0,08$	0,62 $\pm 0,35$	0,33 $\pm 0,16$	2,33 $\pm 0,63$	0,40 $\pm 0,20$	0,87 $\pm 0,28$
0.08	1,78 $\pm 0,78$	0,25 $\pm 0,11$	0,59 $\pm 0,30$	0,76 $\pm 0,40$	0,29 $\pm 0,09$	1,23 $\pm 1,17$	1,27 $\pm 0,69$	0,76 $\pm 0,47$	0,43 $\pm 0,15$
	Valor de P								
Linear	0,35	0,26	0,61	0,65	0,17	0,71	0,81	0,78	0,12
Quadrático	0,72	0,19	0,66	0,14	0,43	0,29	0,03	0,34	0,61
Cúbico	0,79	0,96	0,30	0,82	0,16	0,83	0,65	0,71	0,86

± Erro padrão

5 Discussão

A PON1 é transferida do soro ao fluido folicular em bovinos (SCHNEIDER, et al., 2013) e em humanos, (BROWNE, et al., 2008) sugerindo que sua transferencia é a partir do sangue junto com o HDL. Desta maneira, sugere-se que alterações nos níveis sanguíneos de PON1 alteram sua atividade no fluido folicular, podendo afetar a qualidade do oócito e a fertilidade. Neste estudo, a adição da proteína rPON1 ao meio de MIV foi capaz de gerar atividade enzimática similar à observada *in vivo* no fluido folicular humano (BROWNE et al., 2008) e bovino (SCHNEIDER et al., 2013), suportado pela forte correlação entre a quantidade de proteína (rPON1) adicionada ao meio de MIV e sua atividade enzimática.

A maturação oocitária consiste em uma série de transformações nucleares e citoplasmáticas, que tornam ao oócito competente para ser fecundado, atingir o estágio de blastocisto e ser capaz atingir uma gestação (COMBELLES, 2002). Um dos parâmetros a ser avaliados para determinar o sucesso da MIV e a FIV é a taxa de clivagem, no entanto, neste estudo a suplementação com diferentes níveis de rPON1 durante a MIV não alterou a taxa de clivagem (81-85%), sugerindo que a PON1 não teve efeito na maturação. Isto é semelhante ao relatado por outros autores quando utilizadas diversas substâncias com função antioxidante, tais como quercitina (GUEMRA et al., 2013), cisteamina (GUEMRA et al., 2013; ROCHA, 2012), cisteína, catalase (ROCHA, 2012), insulina-transferrina-selênio, L-ácido ascórbico (PEREIRA 2013) e melatonina (TAKADA, 2008) durante a MIV de oócitos bovinos. Porém, a taxa de clivagem não deve ser considerada como o único indicador de qualidade da maturação oocitária, visto que a literatura descreve que a suplementação com diversas substâncias no meio de MIV e sem diferenças na clivagem, apresentaram diferenças no número e qualidade dos embriões (GUEMRA et al., 2013; ROCHA, 2012; PEREIRA 2013). Neste sentido, Furnus et al. (2008) e Silva, et al. (2011) relatam que a presença de antioxidantes é essencial para a MIV dos oócitos, particularmente para a maturação citoplasmática, que encontra-se diretamente relacionada com a taxa de desenvolvimento embrionário (RIZOS et al., 2002).

O estresse oxidativo durante a MIV é considerado uma das principais causas da baixa eficiência da maturação oocitária e subsequente desenvolvimento embrionário (AGARWAL; GUPTA e SHARMA, 2005). Neste contexto, no presente estudo a adição de doses crescentes de rPON1 ao meio de MIV teve um efeito positivo sobre o desenvolvimento embrionário em D7, suportado pela correlação positiva entre a atividade enzimática de PON1 no meio de MIV e a taxa de blastocistos no D7 do cultivo. Baseado nisso, sugere-se que a PON1 protege as membranas celulares de danos oxidativos e peroxidativos associados ao estresse oxidativo, promovendo um melhor desenvolvimento embrionário. Esses resultados concordam com o exposto por Durrington et al. (2001), que mencionam que a PON1 tem a capacidade de prevenir o aumento das EROs, hidrolisar os peróxidos lipídicos, diminuir a susceptibilidade do HDL e membranas celulares à peroxidação.

Os resultados encontrados neste trabalho concordam com o exposto por Browne et al. (2008) que em humanos encontrou uma relação positiva entre a atividade de PON1 e níveis de APO-I intrafolicular e o desenvolvimento embrionário, sugerindo que o nível de PON1 a que o oócito é exposto tem potencial de proteger suas membranas do estresse oxidativo gerado no meio e ser fundamental na determinação da fertilidade *in vivo*, tanto em humanos quanto em animais domésticos. Desta maneira sugere-se que a PON1 é um dos principais componentes do HDL que está envolvido com sua capacidade antioxidante.

Em condições normais do desenvolvimento embrionário *in vivo* e *in vitro* são observadas algumas características como: fragmentação no DNA, o citoplasma se torna denso e com corpos apoptóticos e vesículas, alteração na permeabilidade da membrana mitocondrial e aumento do retículo endoplasmático. Tais efeitos deletérios, ocorrem em decorrência da presença de EROs originadas da peroxidação lipídica e oxidação de proteínas (WOLF, 2005; SÁ BARRETO, 2007). Neste estudo não foi observada diferença na expressão dos genes Bax, Bcl-2 e MnSOD nas células do *cumulus*, oócitos e embriões em D7 de acordo com o nível de adição de rPON1. Segundo Yang (2002) a família de genes BCL, que inclui o Bax (pró-apoptótico) e Bcl-2 (anti-apoptótico), estão envolvidos na regulação da apoptose. GYU-JIN (2007), também demonstrou que o gene Bax é responsável por induzir a enzima caspase-activated-DNase, responsável pela fragmentação do DNA. Em contraste, o gene Bcl-2 inibe a apoptose através de diferentes mecanismos, como prevenção da liberação de proteínas mitocondriais, ou seja, a relação entre Bax e Bcl-2, pode determinar se

uma célula morre ou vive. Já o gene MnSOD encontra-se associado à atividade mitocondrial, além de possuir papel na diferenciação celular e fornecer uma importante defesa contra dano oxidativo por espécies reativas de oxigênio (LAZZARI, 2011). A variação na expressão dos genes alvo entre tratamentos pode ter sido a causa de não apresentar diferença estatística, isto provavelmente devido à seleção dos embriões no D7, ou seja, durante o desenvolvimento embrionário inicial o embrião passa por uma série constante de alterações físicas e moleculares que conseqüentemente encontram-se relacionadas com a expressão gênica. Ao classificar e coletar embriões de semelhante estágio de desenvolvimento, quanto à morfologia, não significa que sua estrutura e desenvolvimento molecular sejam semelhantes.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, torna-se viável o planejamento e execução de novos experimentos que visem elucidar os efeitos do HDL e seus constituintes (PON1, APOI...) sobre a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Neste sentido, seria interessante testar doses maiores de rPON1 no meio de MIV, assim como a suplementação de rPON1 em outras fases do cultivo embrionário. Além disso, estudar a influência genética (SNPs no gene da PON1) *in vivo* sobre a qualidade oocitária e embrionária, assim como avaliar a capacidade desses produtos em se tornarem uma prenhez.

6 Conclusões

Conclui-se que a adição de rPON1 no meio de MIV é capaz de gerar atividade enzimática similar à observada *in vivo* no fluido folicular humano e bovino. Além disso, a suplementação com rPON1 na MIV tem um efeito positivo na produção *in vitro* de embriões bovinos.

Referências

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

ANDRADE, E.R.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.2, p.79-85, 2010.

ANDRADE, J.C.O.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F. Use steroid hormone treatments prior to superovulation in Nelore donors. **Animal Reproduction Science**, v.69, n.1-2, p.9-14, 2002.

APPASAMY, M.; JAUNIAUX, E.; SERHAL, P.; AL-QAHTANI, A.; GROOME, N.P.; MUTTUKRISHNA, S. Evaluation of the relationship between follicular fluid oxidative stress, ovarian hormones, and response to gonadotropin stimulation. **Fertility and Sterility**, v.89, p.912-921, 2007.

ARLOTTO, T.; SCHWARTZ, J.L.; FIRST, N.L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.45, p.943-956, 1996.

BERTAGNOLLI, A.C.; GONÇALVES, P.B.D.; GIOMETTI, I.C.; COSTA, L.F.S.; OLIVEIRA, J.F.C.; GONÇALVES, I.D.V.; BARRETO, K.P.; EMANUELLI, I.P.; BORGES, L.F.K. Interação entre células do cumulus e atividade da proteína quinase C em diferentes fases de maturação nuclear de oócitos bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.56, n.4, 2004.

BIONAZ, M.; TREISI, E.; CALAMARI, L.; LIBRANDI, F.; FERRARI, A.; BERTONI, G. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.1740-1750, 2007.

BOLAND, M.P.; LONERGAN, P.; O'CALLAGHAN, D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. **Theriogenology**, v.55, p.1323-1340, 2001.

BOSSAERT, P.; TREVISI, E.; OPSOMER, G.; BERTONI, G.; VLIEGHER, S.; LEROY, J.L. The association between indicators of inflammation and liver variables during the transition period in high-yielding dairy cows: an observational study. **The Veterinary Journal**, v.192, p.222-225, 2012.

BRACKETT, B.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.; DONARCICK, W.J.; EVANS, J.F.; DRESSELM, A. Normal development following *In vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v.27, p.147-158, 1982.

BROWNE, R.W.; KOURY, S.; MARION, S.S.; WILDING, G.; MUTI, P.; TREVISAN, M. Accuracy and biological variation of human serum Paraoxonase 1 activity and polymorphism (q192r) by kinetic enzyme assay. **Clinical Chemistry**, n.53, v.2, p.310-317, 2007.

BROWNE, R.W.; SHELLY, W.B.; BLOOM, M.S.; ICQUE, A.J.; SANDLER, J.R.; HUDDLESTON, H.G.; FIJUIIMOTO, V.Y. Distributions of high-density lipoprotein particle components in human follicular fluid and sera and their associations with embryo morphology parameters during IVF. **Human Reproduction**. v.23, p.1884-1894, 2008.

CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; RAMOS, A.A.; VALE FILHO, V.R. Factors influencing *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction**. v.3, n.1, p.19-28, 2006.

CAN, A.; SEMIZ, O.; ÇINAR, O. Centrosome and microtubule dynamics during early stages of meiosis in mouse oocytes. **Mol Hum Reprod**, v.9, p.749-756, 2003.

CARRELL, D.T.; LIU, L.; HUANG, I.; PETERSON, M.; Comparison of maturation, meiotic competence, and chromosome aneuploidy of oocytes derived from two protocols for *in vitro* culture of mouse secondary follicles. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.22, p.347-354, 2005.

CERON, J.J.; TECLES, F.; TVARIJONAVICIUTE, A. Serum paraoxonase 1 (PON1) measurement: an update. **BMC Veterinary Research**, p.1074, 2014.

COMBELLES, C.M.H.; CEKLENIK, N.A.; RACOWSKY, C.; ALBERTINI, D.F. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. **Human Reproduction**, v.17, p.1006-1016, 2002.

COSTA, L.G.; COLE, T.B.; JARVIK, G.P.; FURLONG, C.E. Functional genomics of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity,

cardiovascular disease and drug metabolism. **Annual Review of Medicine**. v.54, p.371-392, 2003.

DA COSTA, L.A. Nutrigenetics and Modulation of Oxidative Stress. **Anais... Nutrition and Metabolism**. v.60, p.27–36, 2012.

DE MATOS, D.G.; GASÁRRINI, B.; PASQUALINI, S.R.; THOMPSON, J.G. Effect of glutathione stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. **Theriogenology**, v.57, p.1443-51, 2002.

DE LOOS, F.; KASTRUP, P.; VAN MAURIK, P.; VAN BENEDEN, T.H.; KRUIP, T.A. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. **Molecular Reproduction and Development**, v.28, n.3, p.255-259, 1991.

DOWLING, D.K.; SIMMONS, L.W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. **Journal of the Royal Society**, v.276, p.1737-1745, 2009.

DRAGANOV, D.I.; WATSON, C.E.; BILLECKE, S.S.; LA DU, B.N. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. **The Journal Biological Chemistry**, v.43, p.33435–33442, 2000.

DRAGANOV D.I.; LA DU B.N. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. **Archives of Pharmacology**, v.369, p.78-88, 2004.

DRAGANOV, D.I.; TEIBER, J.F.; SPEELMAN, A.; OSAWA, Y.; SUNAHARA, R.; LA DU, B.N. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. **Journal of Lipid Research**, v.46, p.1239–1247, 2005.

DURRINGTON, P.N.; MACKNESS, B.; MACKNESS, M.I. Paraoxonase and atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vascular Biology**, v.21, p.473-480, 2001.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v.43, n.4, p.503-512, 1996.

FAIR T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, 78: 203-16, 2003.

FARIN, C.E.; RODRIGUEZ, K.F.; ALEXANDER, J.E.; HERRICK, J.R.; KENNEDY-STOSKOPF, S. The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.97-112, 2007.

FERREIRA, E.L.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R. et al. Maturação citoplasmática de oócitos bovinos: aquisição de competência para o desenvolvimento. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.172-181, 2008.

FUJIMOTO, V.Y.; KANE, J.P.; ISHIDA, B.Y.; BLOOM, M.S.; BROWNE, R.W. High-density lipoprotein metabolism and the human embryo. **Human Reproduction**, v.16, p.20-38, 2010.

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

GUEMRA, S.; MONZANI, P.S.; SANTOS, E.S.; ZANIN, R.; OHASHI, O.M.; MIRANDA, M.S.; ADONA, P.R. Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, p.1616-1624, 2013.

GYU-JIN R.H.O; BALASUBRAMANIAN, S; DONG-SIK K.I.M; WOO-JIN S.O.N; SANG-RAE C.H.O; JUNG-GON K.I.M; MOHANA KUMAR B; SANG-YOUNG C.H.O.E. Influence of *In Vitro* Oxygen Concentrations on Preimplantation Embryo Development, Gene Expression and Production of Hanwoo Calves Following Embryo Transfer. **Molecular Reproduction and development**, V.74, p.486-496, 2007.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Seminars Hematology**, v.26, p.277-285, 1989.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção pecuária municipal**, 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2241&id_pagina=1>. Acesso em: 19 Dez. 2014.

JASPARD, B.; COLLET, X.; BARBARAS, R.; MANENT, J. VIEU, C. PARINAUD, J. CHAP, H. PERRET, B. Biochemical characterization of pre-beta 1 high-density

lipoprotein from human ovarian follicular fluid: evidence for the presence of a lipid core. **Biochemistry**, v.35, p.1352–1357, 1996.

JONES, K.T. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. **Mol. Hum. Reprod.**, v.10, p.1-5, 2004.

KIM, D.S.; MADEN, S.K.; BURT, A.A.; RANCHALIS, J.E.; FURLONG, C.E.; JARVIK, G.P. Dietary fatty acid intake is associated with paraoxonase 1 activity in a cohort-based analysis of 1,548 subjects. **Lipids in Health and Disease**, v.12, p.183-192, 2013.

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

KORDI-TAMANDANI, D.M.; HASHEMI, M.; SHARIFI, N.; KAYKHAEI, M.A.; TORKAMANZEHI, A. Association between paraoxonase-1 gene polymorphism and risk of metabolic syndrome, **Molecular biology reproduction**, v.38, p.1-7, 2011.

KRAUSE, A.R.; PFEIFER, L.F.; MONTAGNER, P.; WESCHENFELDER, M.M.; LIMA, M.E.; XAVIER, E.G.; BRAUNER, C.C.; SCHMITT, E.; DEL PINO, F.A.; MARTINS, C.F.; CORREA, M.N.; SCHNEIDER, A. Associations between resumption of postpartum ovarian activity, uterine health and concentrations of metabolites and acute phase proteins during the transition period in Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, v.145, p.8–14, 2014.

KUBELKA, M.; MOTLIK, J.; SCHULTZ, R.M.; PAVLOK, A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. **Biology of Reproduction**, v.62, p.292-302, 2000.

LAWLOR, D.A.; DAY, I.N.M.; GAUNT, T.R.; HINKS, L.J.; TIMPSON, N.; EBRAHIM, S. DAVEY, S.G. The association of the paraoxonase (PON1) Q192R polymorphism with depression in older women: findings from the British Women's Heart and Health Study. **Epidemiology Community Health**, v.61, p.61-85, 2007.

LAZZARI, G.; COLLEONI, S.; DUCHI, R.; GALLI, A.; HOUGHTON, F.D.; GALLI, C. Embryonic genotype and inbreeding affect preimplantation development in cattle. **Reproduction**. v.141, n.1, p.625–632, 2011.

LEROY, J.L.M.R.; OPSOMER, G.; DE VLIEGHER, S.; VANHOLDER, T.; GROSSENS, L.; GELDHOF, A.; BOLS, P.E.J. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.612-622, 2008.

LI, R.; ALBERTINI D.F. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.14, p.141–152, 2013.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.37, p.293-303, 2001.

LIVINGSTON, T.; RICH, K.; MACKENZIE, S.; GODKIN, J.D. Glutathione content and antioxidant enzyme expression of in vivo matured sheep oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.116, p.265-273, 2009.

LONERGAN, P.; FAIR, T. The ART of studying early embryo development: Progress and challenges in ruminant embryo culture. **Theriogenology**, v. 81, p.49-55, 2014.

LUCY, M.C. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for postpartum nutrition and reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, n.2, p.31–39, 2008.

MASTERNAK, M.N.; AL-REGAJEY, K.A.; DEL ROSARIO LIM, M.N.; BONKOWSKI, M.S.; PANICI, J.A.; PRZYBYLSKI, G.K.; BARTKE, A. Caloric restriction results in decreased expression of peroxisome proliferator-activated receptor superfamily in muscle of normal and long-lived growth hormone receptor/ binding protein knockout mice. **The Journals of Gerontology**, v.60, p.1238–1245, 2005.

MAYES, M.; SIRARD, M.A. The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. **Theriogenology**, v.55, p.911-922, 2001.

MEINECKE, B.; JANAS, U.; PODHAJSKY, E.; MEINECKE-TILLMANN, S. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reprod. Domest. Anim.**, v.36, p.183-188, 2001.

MELLO FILHO, A.C.; HOFFMAN, M.E.; MENEHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochemical Journal**, v.5, p.218:273, 1983.

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

MOORE, C.E.; KAY, J.K.; COLLIER, R.J.; VANBAALE, M.J.; BAUMGARD, L.H. Effect of supplemental conjugated linoleic acids on heat-stressed Brown Swiss and Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.1732–1740, 2005.

NASR-ESFAHANI, M.H.; AITKEN, J.R.; JOHNSON, M.H. Hydrogen peroxide levels in mouse oocyte and early cleavage stages embryos developed in vitro or in vivo. **Development**, v.109, p.501-507, 1990.

NG, C.J.; WADLEIGH, D.J.; GANGOPADHYAY, A.; HAMA, S.; GRIJALVA, V.R.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A.M.; REDDY, S.T. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. **Journal Biology Chemistry**, v.276, p.44444–44449, 2001.

PEIXOTO, M.G.C.D.; FONSECA, C.G.; PENNA, V.M., et al. Análise multivariada de resultados da ovulação múltipla seguida de transferência de embriões de doadoras zebuínas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.5, 2002.

PEREIRA, Sidney Alcântara. **Efeito da Presença da Insulina-Transferrina-Selênio (ITS) e L-ácido Ascórbico (AA) na Produção in vitro de Embriões Bovinos**. 2013. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

PEZZULO, A.A.; HORNICK, E.E.; RECTOR, M.V.; ESTIN, M.; REISETTER, A.C.; TAFT, P.J.; BUTCHER, S.C.; CARTER, A.B.; MANAK, J.R.; STOLTZ, D.A.; ZABNER, J. Expression of human paraoxonase 1 decreases superoxide levels and alters bacterial colonization in the gut of *Drosophila melanogaster*. **PLoS One**, v. 7, p.43777, 2012.

PINCUS, G.; ENZMANN, E. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. I. The activation of ovarian eggs. **Journal of Experimental Medicine**, v. 62, p.665-675, 1935.

PRÉCOURT, L.P.; AMRE, D.; DENIS, M.C.; LAVOIE, J.C.; DELVIN, E.; SEIDMAN, E.; LEVY, E. The tree-gene paraoxonase family: Physiologic roles, actions and regulation. **Atherosclerosis**, v.214, p.20-36, 2011.

PRIMO-PARMO, S.L.; SORENSON, R.C.; TEIBER, J., DU B.N.L. The Human Serum Paraoxonase/Arylesterase Gene (PON1) Is One Member of a Multigene Family. **Genomics**, v.33, p.498–507, 1996.

RICHARD, F. J.; SIRARD, M. A. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II. Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. **Biology of Reproduction**, v.54, n.1, p.22-28, 1996.

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

ROCHA, Nathália Alves de Souza. **Efeitos de antioxidantes e da atmosfera gasosa em diferentes etapas da produção in vitro sobre o desenvolvimento e criotolerância de embriões bovinos**. 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

RODRIGUEZ, K. F.; FARIN, C. E. Developmental capacity of bovine cumulus oocytes complexes after transcriptional inhibition of germinal vesicle breakdown. **Theriogenology**, v.61, p.1499-1511, 2004.

SÁ BARRETO, L.S. **Avaliação dos efeitos da inibição da maturação nuclear e de antioxidantes sobre a maturação oocitária, fecundação e desenvolvimento embrionário bovino in vitro**. 2007. 88f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

SBTE, Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em 2011: mudanças e tendências futuras. **Jornal O Embrião**. v.52, p.6-10, 2012.

SCHNEIDER A, CORREA M.N, BUTLER W.R. Short communication: acute phase proteins in Holstein cows diagnosed with uterine infection. **Research in Veterinary Science**. n.95, p.269-271, 2013.

SCHNEIDER, A.; ABSALON-MEDINA, V.; ESPOSITO, G.; CORREA, M.; BUTLER, W. Paraoxonase (PON) 1, 2 and 3 Expression in Granulosa Cells and PON1 Activity

in Follicular Fluid of Dairy Cows. **Reproduction in Domestic Animals**, 48:989-994, 2013.

SCHRADER, C.; RIMBACH, G. Determinants of paraoxonase 1 status: genes, drugs and nutrition. **Current Medicinal Chemistry**, v.18, p.5624-5643, 2011.

SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.67, p.37-43, 2001.

SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; ANDRADE, E.R. Aspectos técnicos e biológicos da obtenção de oócitos bovinos: revisão de literatura. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, n. 1, p. 101-110, 2002.

SILVA, G.M.; ARAÚJO, V.R.; DUARTE A.B.G; LOPES, C.A.P.; FIGUEIREDO, J.R. Papel dos antioxidantes no cultivo *in vitro* de células ovarianas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.315-326, 2011.

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

STOJKOVIC, M.; MACHADO, A.S.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P.B. et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. **Biol Reprod.**, v.64, p.904-9, 2001.

TAKADA, Luciana. **Efeito da melatonina sobre a maturação de ovócitos em sistema tradicional de produção *in vitro* de embriões bovinos**. 2008. 77 f. Dissertação (Doutorado em Zootecnia)- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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

WANG, X.; FALCONE, T.; ATTARAN, M.; GOLDBERG, J.M., AGARWAL, A.; SHARMA, R.K. Vitamin C and Vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility and Sterility**, v.78, p.1272-1277, 2002.

WOLF, A. **Estímulo da síntese de glutathione na maturação in vitro de oócitos bovinos e sua influência no desenvolvimento embrionário.** 2005. 101f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Botucatu, 2005.

YANG, M.Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Expressão de proteínas Bcl-2 e Bax em relação à qualidade de oócitos bovinos e embriões produzidos *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.70, p.159-169, 2002.