

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**EFEITO DA TENSÃO DE OXIGÊNIO E DA DENSIDADE DE OÓCITOS
NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS E A RELAÇÃO
COM O ESTRESSE OXIDATIVO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Angelo Bertani Giotto

Uruguaiana, RS, Brasil

2013

ANGELO BERTANI GIOTTO

**EFEITO DA TENSÃO DE OXIGÊNIO E DA DENSIDADE DE OÓCITOS
NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS E A RELAÇÃO
COM O ESTRESSE OXIDATIVO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Gallas Leivas
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela dos Santos
Brum

Uruguiana

2013

ANGELO BERTANI GIOTTO

**EFEITO DA TENSÃO DE OXIGÊNIO E DA DENSIDADE DE OÓCITOS
NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS E A RELAÇÃO
COM O ESTRESSE OXIDATIVO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal

Dissertação defendida e aprovada em 02 de agosto de 2013.

Banca examinadora:

Dr^a. Silvia Ferreira Carambula

Dr. Fernando Silveira Mesquita
Universidade Federal do Pampa

Dr.Fábio Gallas Leivas
Universidade Federal do pampa
Orientador

Dedico esta dissertação aos meus pais que em todos os momentos estiveram ao meu lado me incentivando e dando todo o suporte para a minha formação

Agradecimentos

Aos meus pais, Ênio e Méri, por terem sempre me apoiado, estando ao meu lado em todos os momentos, sempre me incentivando a estudar e me proporcionando oportunidades de crescimento. A minha irmã Diana e minha sobrinha e afilhada Amábile, pela amizade e carinho que vocês tem me proporcionado.

Aos meus orientadores, Dr. Fábio Gallas Leivas e Dr^a. Daniela dos Santos Brum pelos ensinamentos, confiança, paciência e também pela amizade construída neste período.

Aos colegas Antônio e Cibele pela dedicação que tiveram com este trabalho e também pelos mates, risadas, conversas fiadas, estudos, companheirismo e amizade formada nestes 2 anos.

A equipe do Biotech, Aline, Cecília, Nati, Dani, Fabi, pela dedicação e amizade que sempre se fizeram presentes.

A Dra. Francielli Weber Santos Cibin e a equipe do Laboratório de Bioquímica, Aryele, Cristiano, Flávio, Laura, Melina, pela grande ajuda na execução desta pesquisa e pela grande amizade.

A Unipampa, ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade e estrutura para realizar mais esta etapa de minha vida.

Ao MARFRIG – Alegrete e seus funcionários por terem recebido nossa equipe em suas instalações para coleta de ovários, imprescindível para esta pesquisa, assim como a Alta Genetics pela cedência do sêmen.

A todos, que de alguma forma colaboraram para a realização de mais esta etapa.

Obrigado!

“Quem sabe a alma desta fronteira vá mais além
porteira aberta pra os rumos tantos que a vida mostra
a vida é assim, nos põe na cruz de uma encruzilhada
pra escolher a estrada e buscar aquilo que mais se gosta”

Gujo Teixeira

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Fundação Universidade Federal do Pampa

EFEITO DA TENSÃO DE OXIGÊNIO E DA DENSIDADE OÓCITOS NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS E A RELAÇÃO COM O ESTRESSE OXIDATIVO.

AUTOR: ANGELO BERTANI GIOTTO
ORIENTADOR: FÁBIO GALLAS LEIVAS
Uruguaiana-RS, 02 de agosto de 2013.

A maturação *in vitro* (MIV) é um dos pontos críticos da produção *in vitro* de embriões bovinos, sendo que vários fatores podem interferir na MIV, como a tensão de oxigênio e a densidade de oócitos por volume de meio. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da tensão de oxigênio associada a diferentes densidades de oócitos durante a MIV. Para tanto, três experimentos foram conduzidos com oócitos bovinos obtidos de ovários de abatedouro. O experimento I consistiu na avaliação da maturação citoplasmática e nuclear, o experimento II na avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e atividade antioxidante, e o experimento III na avaliação das taxas de fecundação *in vitro*. Após a seleção, os oócitos foram submetidos a MIV distribuídos aleatoriamente em 4 tratamentos: Tratamento 1:10/5%: 1 oócito em 10 μ l de meio de MIV em 5% de O₂; Tratamento 1:10/20%: 1 oócito em 10 μ l de meio em 20% de O₂; Tratamento 1:20/5%: 1 oócito em 20 μ l em 5% de O₂ e Tratamento 1:20/20%: 1 oócito em 20 μ l de meio em 20% de O₂. A MIV foi conduzida em grupos de 15 oócitos em meio TCM 199 modificado, acrescido de FSH, LH, EGF, soro de égua em estro (SEE) e piruvato por 24h. Decorrido o período de MIV foi conduzida a fecundação *in vitro* em gotas de 300 μ l de meio Fert-TALP, sendo realizada pelo co-cultivo de oócitos e espermatozoides (2x10⁶sptz/mL) selecionados por gradientes de mini-Percoll por 18h. No

experimento I, as taxas de maturação nuclear (69,66%) e maturação citoplasmática (71,55%) foram similares entre os tratamentos ($P>0,05$). No experimento II, a produção de ROS foi avaliada nos oócitos e no meio de MIV, assim como a atividade antioxidante foi avaliada após 24 h de MIV. A produção de ROS pelos oócitos foi superior nos tratamentos com baixa tensão de oxigênio (5%; 13,3UF) em relação a alta tensão de oxigênio (20%; 7,0UF) independentemente da densidade de oócitos ($P<0,05$). Os níveis de ROS detectados no meio de MIV foram superiores nos tratamentos com alta densidade de oócitos (1:10) independentemente da tensão de oxigênio ($P<0,05$). A atividade da SOD (21,3UI) e os níveis de GSH (6,95 nmol GSH/ml) mensurados nos oócitos foram similares entre os tratamentos ($P>0,05$). As taxas de fecundação e penetração foram superiores nos tratamentos com 20% de O_2 e com alta densidade de oócitos (1:10; 48,8%) em relação aos tratamentos 1:10/5% (29,5%) e 1:20/20% (29,1%; $P<0,05$). Adicionalmente a taxa de polispermia foi maior no tratamento com alta tensão de oxigênio e baixa densidade de oócitos. (1:20/20%; 27.8%) em relação ao tratamento 1:10/20% (13,41%; $P<0,05$). Os resultados deste estudo mostram interação entre a tensão de oxigênio e a densidade de oócitos aumentando a produção de ROS em determinadas associações e influenciando posteriormente as taxas de fecundação *in vitro* de oócitos bovinos.

Palavras chave: Maturação *in vitro*; espécies reativas de oxigênio; tensão de oxigênio; densidade de oócitos; fecundação *in vitro*; bovinos.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Program of Post-Graduation in Animal Science
Federal University of Pampa

EFFECT OF OXYGEN TENSION AND OOCYTE DENSITY UTILIZED ON IN VITRO MATURATION OF BOVINE OOCYTES AND THE RELATIONSHIP WITH THE OXIDATIVE STRESS

AUTHOR: ANGELO BERTANI GIOTTO

ADVISOR: FABIO GALLAS LEIVAS

Uruguaiana, August 02, 2013.

The *in vitro* maturation is one of the critical points on *in vitro* production of bovine embryos so many factors can do an interference on IVM, like oxygen tension and oocyte density by volume of medium. The aim of this study was evaluate the effects of association of oxygen tension with different oocyte density during IVM Three experiments were performed with bovine oocytes obtained from abattoir ovaries, on experiment I was performed the nuclear and cytoplasmic evaluation, on the experiment III the biochemical assay of ROS production and antioxidant activity and on experiment III was realized the evaluation of *in vitro* fertilization. After selection, the oocytes were randomly distributed in 4 treatments: Treatment 1:10/5%: 1:10 μ l in 5% of O₂; Treatment 1:10/20%: 1:10 μ l in 20% of O₂; Treatment 1:20/5%: 1:20 μ l in 5% of O₂; Treatment 1:20/20%: 1:20 μ l in 20% of O₂. The IVM was performed in droplets (150 μ l or 300 μ l) of TCM 199 plus FSH, LH, EGF, EMS and pyruvate. The IVF were performed in droplets (300 μ l) of Fert-TALP. Was realized IVF with oocytes and spermatozoa (2x10⁶sptz/mL) selected by Percoll density gradients for 18h. On experiment I, the nuclear maturation rates (69.66%) and reorganization mitochondrial

(71.55%) rates were similar among treatments ($P>0.05$). In Experiment II, the ROS production in oocytes, IVM medium and antioxidant activity were evaluated after 24 h of IVM. ROS production in oocytes was higher on treatments with low tension (5%; 13.3 UF) than 20% oxygen tension (7.0 UF) independently of oocyte density ($P<0.05$). ROS levels on IVM medium was higher on treatments with high oocyte density (1:10) independently of oxygen tension ($P<0.05$). The GSH levels (6.95 nmol GSH/ml) and SOD activity (21.3UI) were similar among treatments ($P>0.05$). The rates of normal fertilization and normal penetration were higher in treatments with 20% of O_2 with high oocyte density (1:10;48.8%) than treatments 1:10/5% (29.5%) and 1:20/20% (29.1%; $P<0.05$). In addition the polysperm rates were higher on treatment with high oxygen tension and low oocyte density (1:20/20%; 27.8%) than treatment 1:10/20% (13.4%; $P<0.05$). The results of this study show an interaction between oxygen tension and oocyte density, that increase ROS production on certain associations and subsequently affects the IVF rates.

Key-words: *In vitro* maturation, ROS, oxygen tension, oocyte density, *in vitro* fertilization, bovine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:

Microscopia de fluorescência de oócitos bovinos em diferentes fases da maturação nuclear _____ **19**

Figura 2:

Microscopia confocal de oócitos bovinos demonstrando a reorganização das mitocôndrias _____ **20**

Figura 3:

Esquema da maturação nuclear e citoplasmática de oócitos do estágio de vesícula germinativa ao estágio de metáfase II e zigoto após a fecundação _____ **21**

Figura 4:

Esquema da produção de ROS pelo metabolismo da mitocôndria e controle das ROS pelo sistema antioxidante da célula _____ **25**

Artigo

Figura 1:

Reactive oxygen species production in oocyte and IVM medium after 24 hours of culture in different oxygen tension and oocyte density. _____ **49**

LISTA DE TABELAS

Artigo

Table 1:

Percentages of normal fertilization (NF), normal penetration (NP), polyspermic penetration (PP), normal penetration and normal fertilization (NF) on oocytes matured *in vitro* using different oxygen tension and different oocyte density medium. _____ **50**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANOVA:** Análise de variância
- ATP:** Adenosina Trifosfato
- BSA:** Albumina sérica bovina
- Ca²⁺:** Ion Cálcio
- CCO:** Complexo Cumulus oócito
- CIV:** Cultivo *in vitro*
- Cl₂:** Cloreto
- CM:** Maturação citoplasmática
- CO₂:** Dióxido de Carbono
- CP:** Corpúsculo Polar
- DCHF-DA:** 2'7' Diclorofluoresceína Diacetato
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- EGF:** Fator de crescimento epidermal
- EMS:** Estrus Mare serum
- FIV:** Fecundação *in vitro*
- FN:** Fecundação normal
- NPF:** Fecundação Normal e Penetração Normal
- FSH:** Hormônio folículo estimulante
- GPx:** Glutathione Peroxidase
- GSH:** Glutathione reduzida
- GSSH:** Glutathione Dissulfeto
- GR:** Glutathione reductase
- H₂O₂:** Peróxido de hidrogênio
- HCl:** Ácido Clorídrico
- ICSI:** Injeção intracitoplasmática de espermatozoide
- IVF:** *In vitro* fertilization
- IVM:** *In vitro* maturation
- LH:** Hormônio luteinizante
- Mg₂:** Magnésio

MIV: Maturação *in vitro*
MT: Mitotracker Green FM
N₂: Nitrogênio
NaCl: Cloreto de Sódio
NF: Fecundação Normal
NM: Maturação Nuclear
NP: Penetração
O₂: Oxigênio molecular
O₂^{•-}: Ânion superóxido
OPU: Aspiração folicular guiada por ultrassom
PBS: Solução Salina Fosfatada
NPF: Penetração e Fecundação normal
PIV: Produção *in vitro*
PP: Penetração Polispérmica
PVA: Álcool Polivinílico
ROS: Espécies reativas de oxigênio
SEE: Soro de égua em estro
SFB: Soro Fetal Bovino
SOD: Superóxido dismutase
SPTZ: Espermatozóide
TCM 199: Meio de Cultivo Celular 199
UF: Unidades de fluorescência
OH: Radical Hidroxila

SUMÁRIO

Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de Ilustrações	xi
Lista de Tabelas	xii
Lista de Abreviaturas	xiii
1. Introdução	17
2. Revisão Bibliográfica	19
2.1. Maturação de oócitos bovinos	19
2.2. Tensão de oxigênio na maturação <i>in vitro de oócitos bovinos</i>	22
2.3. Densidade de oócitos na maturação <i>in vitro de oócitos bovinos</i>	23
2.4. Estresse oxidativo	24
3. Objetivos	27
3.2 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4. Artigo Científico	28
Abstract	29
1. Introduction	30
2. Material and Methods	32
2.1 <i>Oocyte recovery and selection</i>	32
2.2 <i>In vitro maturation</i>	32
2.3 <i>In vitro fertilization</i>	33
2.4 <i>Cytoplasmic maturation evaluation</i>	33
2.5 <i>Nuclear maturation evaluation</i>	34
2.6 <i>Evaluation of the production of Reactive oxygen species</i>	34
2.7 <i>Evaluation of GSH levels and SOD activity</i>	34
2.8 <i>Evaluation of in vitro fertilization</i>	35
2.9 <i>Statistical analyses</i>	35
2.10 <i>Experimental design</i>	36

2.11 Experiment I: Evaluation of nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes in vitro matured on different oxygen tension and different oocyte density by	36
2.12 Experiment II: Evaluation of ROS production in oocytes and in IVM medium, and evaluation of antioxidant system in oocytes in vitro matured on different oxygen tension and different oocyte density	37
2.13 Experiment III: IVF evaluation of oocytes in vitro matured on different oxygen tension and different oocyte density	37
3. Results	37
3.1 Experiment I: Evaluation of Nuclear and Cytoplasmic maturation of bovine oocytes in vitro matured	38
3.2 Experiment II: Evaluation of ROS production in oocytes and in IVM medium and antioxidant system in oocytes in vitro matured	38
3.2.1: Production of reactive oxygen species	38
3.2.2. Antioxidant System Evaluation	38
3.3 Experiment III: IVF evaluation of oocytes in vitro matured on different system	39
4. Discussion	39
5. References	42
5. CONCLUSÕES	51
6. PERSPECTIVAS	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXOS	59

1. INTRODUÇÃO

A Produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos teve um acelerado avanço nas pesquisas após o nascimento do primeiro terneiro produzido a partir de Fecundação *in vitro* (FIV), em 1981 (Brackett *et al.*, 1982). Atualmente a PIV é responsável por 90% dos embriões produzidos no Brasil, representando 58,7% dos embriões bovinos produzidos *in vitro* no mundo (Viana, 2012). A utilização da PIV de embriões permite maximizar a produção da fêmea, sendo possível produzir maior número de produtos num determinado período de tempo. Adicionalmente tornou-se possível produzir embriões de fêmeas com infertilidade adquirida e até mesmo de fêmeas gestantes. A PIV também serve como base para outras tecnologias da reprodução assistida como a injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) e clonagem, além de ser uma importante ferramenta para estudos básicos de entendimento dos processos e modificações que ocorrem durante a maturação de oócitos, fecundação e desenvolvimento embrionário.

Embora a PIV possa ser considerada em grande parte uma técnica já estabelecida, muitos dos seus aspectos ainda estão em desenvolvimento e necessitam de mais estudos para sua total compreensão e melhor aproveitamento da técnica. Os resultados de desenvolvimento embrionário e taxas de gestação relatadas atualmente são considerados satisfatórios, porém quando comparados aos resultados obtidos *in vivo*, nota-se que ainda podem ser melhorados, como por exemplo, quando se avalia a influência da Maturação *in vitro* (MIV) no processo de PIV de embriões. Estudos mostram que apesar da maturação nuclear de oócitos bovinos *in vitro* comumente chegar a 80-90% (Lonergan *et al.*, 2003), somente 30 à 40% destes desenvolvem-se até o estágio de blastocisto. Estes dados quando comparados a oócitos maturados *in vivo* e fecundados *in vitro*, que podem chegar a 80% de blastocistos (Blondin *et al.*, 2002), demonstram que o processo de MIV está sendo ineficiente e influenciando negativamente os resultados de PIV de embriões bovinos. A MIV pode ser afetada por diversos fatores relacionados com a qualidade dos oócitos e as condições de cultivo utilizadas nesta fase.

Em relação às condições de cultivo utilizadas durante a MIV pode-se citar a tensão de oxigênio e a densidade de oócitos por volume de meio utilizados durante a MIV. Comumente a MIV é conduzida sob tensão de oxigênio próxima a 20%, tensão esta superior à encontrada no trato reprodutivo das fêmeas bovinas e no do líquido folicular que varia entre 1,3 e 8,5% (Mastroianni & Jones, 1965; Banwell *et al.*, 2007). Diferentes estudos sugerem que esta

tensão utilizada na MIV pode levar a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) devido a produção de radicais livres que é favorecida pela alta concentração de oxigênio, podendo estabelecer o estresse oxidativo, que é nocivo ao oócito e ao desenvolvimento embrionário precoce (Agarwal *et al.*, 2006; Goud *et al.*, 2008). A redução na tensão de oxigênio durante a MIV sugere uma maior competência do oócito ao desenvolvimento embrionário (Miller & Rorie, 2000), porém há uma discrepância nos resultados obtidos por vários pesquisadores, quando avaliaram as diferentes tensões de oxigênio na MIV, podendo este ser um aspecto a ser estudado na MIV e seus efeitos sob a FIV e desenvolvimento embrionário.

Outro fator limitante na MIV é a densidade de oócitos utilizada por volume de meio durante esta fase. Quando se utiliza oócitos oriundos de ovários de abatedouros, o número de oócitos durante a MIV é constante, porém com o avanço da aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU), este número de oócitos durante a MIV é variável devido a fatores como raça da doadora (*Bos taurus X Bos indicus*), condição fisiológica (gestante ou não), estágio do ciclo estral e outros fatores individuais de cada doadora. Apesar deste número de oócitos não ser constante, o volume de meio utilizado por diferentes protocolos não é ajustado. Sabe-se que a maturação em grupos de oócitos é favorável ao desenvolvimento embrionário, porém também há competição entre os oócitos e as células do *cumulus oophorus* pelos nutrientes do meio de MIV e pelo oxigênio disponível. Neste sentido, baixas tensões de oxigênio podem ser insuficientes para a geração de energia no oócito. A associação destas variáveis durante a maturação pode afetar diretamente a maturação dos oócitos e posteriormente a fecundação e desenvolvimento embrionário, através da produção de ROS e consequente instalação do estresse oxidativo. Neste sentido, a utilização de alta tensão de oxigênio pode causar um aumento na produção de ROS em oócitos bovinos e então alterar a dinâmica dos processos de maturação e a fecundação *in vitro*, bem como a alta densidade de oócitos pode resultar em competição pelo oxigênio disponível e nutrientes.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência direta da MIV em diferentes tensões de oxigênio (5% e 20%) e diferentes densidades de oócitos por volume de meio (1:10 μ l e 1:20 μ l) sobre a maturação nuclear, citoplasmática, produção de ROS, defesas antioxidantes e taxas de fecundação *in vitro* de oócitos bovinos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Maturação de oócitos bovinos

A maturação do oócito é condição essencial para que ocorra a fecundação e posterior desenvolvimento embrionário (Dieleman, *et al.*, 2002). *In vivo* o processo de maturação ocorre quando a liberação de LH atinge frequência e amplitude necessária para estimular a retomada da meiose e ocorre a passagem do oócito do estágio de vesícula germinativa (prófase I) para o estágio de metáfase II. No entanto, *in vitro*, este processo se inicia no momento da retirada do *Complexo-Cumulus-Oócito* (CCO) do contato das células foliculares e do líquido folicular (Sirard, 2001). A maturação *in vivo* ou *in vitro*, compreende eventos de maturação nuclear e citoplasmática, sendo esta etapa essencial e de grande influência para que um oócito seja fecundado e posteriormente tenha desenvolvimento embrionário normal.

A maturação nuclear ocorre com a quebra da vesícula germinativa, caracterizada pela condensação da cromatina, desaparecimento do nucléolo e a extrusão do primeiro corpúsculo polar ao espaço perivitelínico, passando este oócito ao estágio de metáfase II, onde se mantém até que ocorra a penetração do espermatozoide (Bevers *et al.*, 1996; Van den Hurk & Zhao, 2005, Gonçalves *et al.*, 2007; Gottardi & Mingoti, 2009).

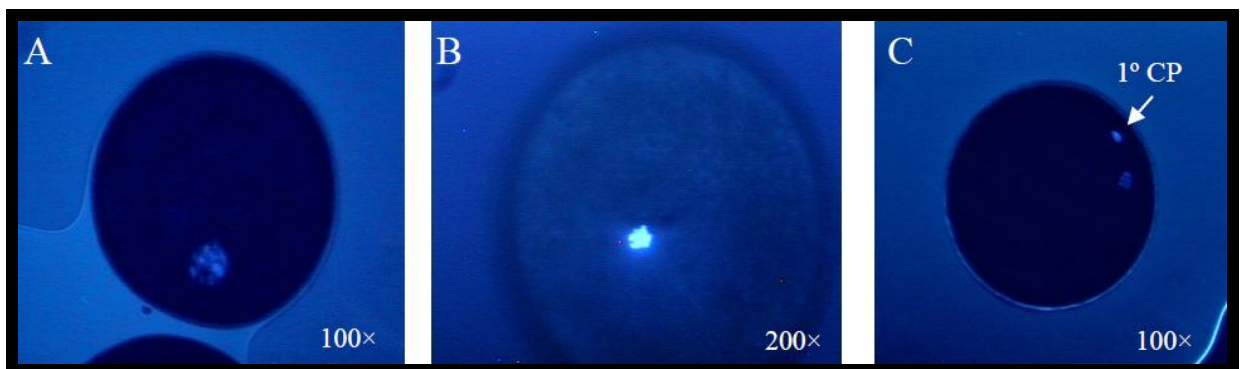


Figura 1: Microscopia de fluorescência de oócitos bovinos em diferentes fases da maturação nuclear.. A) oócito em vesícula germinativa; B) Oócito em metáfase I; C) Oócito em metáfase II com extrusão do 1º corpúsculo polar (CP). Fonte: Gottardi & Mingoti, 2009.

A maturação citoplasmática ocorre paralelamente à maturação nuclear sendo de suma importância a sincronia entre as mesmas. Em uma fase inicial deste processo, quando o oócito ainda se encontra no folículo, a energia para sua manutenção é transmitida de forma passiva através das células da granulosa (Tarazona *et al.*, 2006), porém, após a ovulação ou aspiração

folicular é necessário que o mesmo produza energia para sua manutenção. Esta energia deverá ser produzida pelas mitocôndrias, que migram da periferia do citoplasma para os centros de maior necessidade de adenosina trifosfato (ATP), localizados na região perinuclear (Bavister & Squirrel, 2000). Portanto, durante o estágio de vesícula germinativa, as mitocôndrias estão presentes na periferia do citoplasma do oócito e após o pico pré ovulatório de LH (*in vivo*) ou a retirada do oócito do folículo (*in vitro*), quando o oócito atinge o estágio de metáfase II, as mitocôndrias devem ter assumido uma posição perinuclear no citoplasma (FIG 2; Ferreira, *et al.*, 2008).

Estudos realizados *in vitro* demonstram que o papel da mitocôndria é essencial para o desenvolvimento de embriões de mamíferos (Wang *et al.*, 2009; Van Blerkom, 2011). A mitocôndria, com sua atividade regular, é responsável pela geração de ATP e homeostase do cálcio. Alterações na atividade da mitocôndria comprometem o desenvolvimento celular pela indução de síntese de cromossomos anormais, falhas na maturação e fecundação, além de induzir a fragmentação celular (Brookes *et al.*, 2004). A produção efetiva de ATP durante a maturação de oócitos bovinos é associada à produção de blastocistos de maior qualidade (Stojkovic *et al.*, 2001), assim como os níveis de ATP durante a MIV também estão associados ao sucesso da fecundação dos oócitos em humanos. (Van Blerkom *et al.*, 1995).

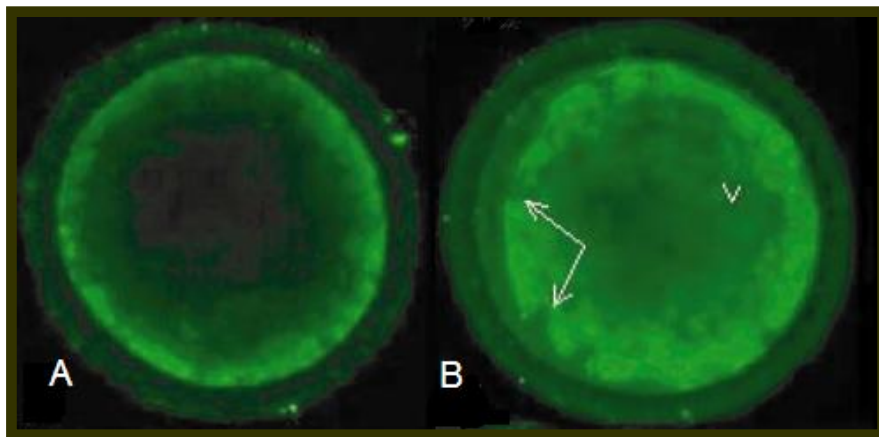


Figura 2: Microscopia confocal de oócitos bovinos demonstrando a reorganização das mitocôndrias. A) Mitocôndrias presentes na periferia do citoplasma do oócito não maturado; B) Mitocôndrias, dispersas por todo o citoplasma após a MIV. Fonte: Stojkovic *et al.*, 2001.

Outra organela que sofre um reposicionamento durante a MIV são os grânulos corticais, que em oócitos imaturos estão dispersos no citoplasma, agrupados em *clusters*. Após a maturação do oócito, estes migram para a periferia do citoplasma (FIG 3; Gotardi &

Mingoti, 2009; Wang *et al.*, 1997) onde permanecem para exercer sua função de evitar a polispermia durante a fecundação (Ferreira, *et al.*, 2009; Abeydeera, 2002).

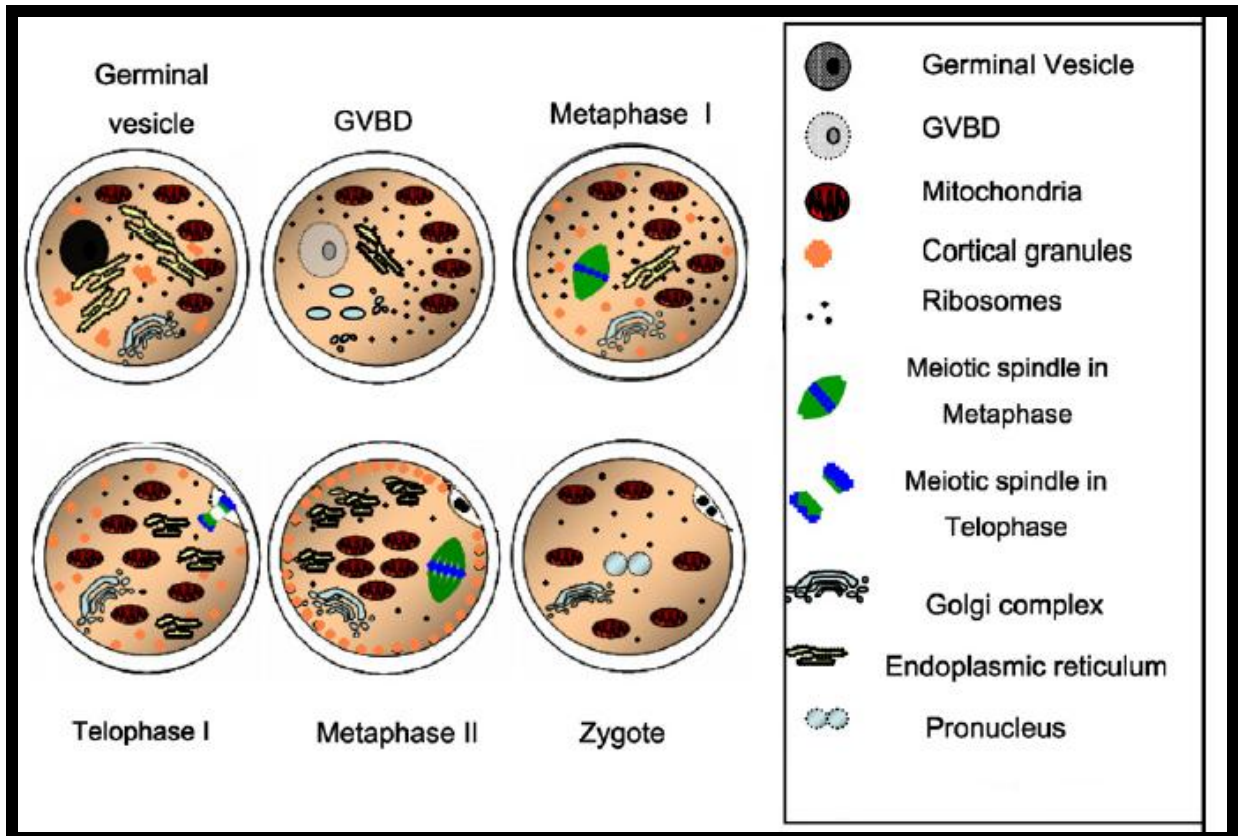


Figura 3: Esquema da maturação nuclear e citoplasmática de oócitos do estágio de vesícula germinativa ao estágio de metafase II e zigoto após a fecundação. Fonte: Adaptado de Ferreira *et al.*, 2009.

A incapacidade de um oócito maturado *in vitro* ser fecundado e desenvolver-se até blastocisto, pode ser atribuída a defeitos intrínsecos no oócito que muitas vezes não são identificados e também as condições de cultivo *in vitro* às quais os oócitos são submetidos durante a MIV (Palma, 2008) ou ainda por uma combinação destes fatores (Lonergan *et al.*, 2003). Além de reduzirem a capacidade de maturação de um oócito, estes fatores podem afetar a eficiência da fecundação e do desenvolvimento embrionário. Quando a maturação ocorre *in vivo*, existe uma sincronia entre maturação nuclear e citoplasmática, no entanto, na MIV este processo é influenciado por diferentes fatores que podem alterar esta dinâmica. Entre os fatores que influenciam o processo de maturação podem-se citar as condições atmosféricas e a densidade de oócito, bem como o efeito das espécies reativas de oxigênio.

2.2 Tensão de Oxigênio na maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

A MIV de oócitos bovinos é comumente conduzida sob atmosfera gasosa de 5% de CO₂ em ar, sendo nestas condições a tensão de oxigênio de aproximadamente 20%. Entretanto, a quantidade de oxigênio dissolvido no fluido folicular e no oviduto varia entre 1,3 e 8,5% (Banwell *et al.*, 2007). Estudos em bovinos demonstram que a tensão encontrada no trato reprodutivo das fêmeas é em torno de 5% (Mastroianni & Jones, 1965). Portanto a tensão de oxigênio utilizada na MIV (20%) é superior à encontrada nas condições de maturação *in vivo*. Muitos estudos sugerem que alta tensão de oxigênio *in vitro* pode induzir ao estresse oxidativo devido ao aumento das espécies reativas de oxigênio (Gigli *et al.*, 2006; Guerin *et al.*, 2001; Hashimoto *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 1998; Fowler *et al.*, 1978), em contrapartida, estudos indicam que uma baixa tensão de oxigênio (5-7%) pode ser insuficiente para manter o metabolismo do oócito (Gigli, *et al.*, 2006).

O oxigênio tem um importante papel no metabolismo de diferentes tipos celulares, como células somáticas, gametas e embriões (Hirao, *et al.*, 2012), pois se torna um elemento chave para que ocorra a fosforilação oxidativa. No oócito, este O₂ deve chegar com quantidade suficiente para geração de ATP, que é essencial para permitir as modificações necessárias para que se alcance o estágio de metáfase II. Miller & Rorie (2000) descrevem que a tensão de oxigênio de 5% durante a MIV aumenta a produção de blastocistos em relação a 20% de O₂, sugerindo que esta atmosfera proporciona uma maior competência do oócito, permitindo uma maior chance de desenvolvimento embrionário. Da mesma forma, Kitagawa *et al.*, (2004) observaram uma maior produção de blastocistos quando utilizada a tensão de 5% de O₂ na maturação de oócitos suínos. Adam *et al.*, (2004) utilizando oócitos de ratos, observaram taxas de clivagem superiores quando maturados em 5% de O₂ em relação a 20% de O₂. No entanto, neste mesmo estudo não houve diferença no desenvolvimento das estruturas clivadas até blastocistos, embora o número de células embrionárias tenha sido maior nos grupos em que os oócitos foram maturados em 5% de O₂ em relação aos maturados a 20% de O₂. De Castro e Paula *et al.*, (2007) demonstraram que os oócitos maturados em 5% de O₂ com adição de 5,6mM de glicose ao meio SOF e ao meio TCM 199 tiveram um menor desenvolvimento até blastocistos quando comparados a concentração de 20% de O₂. Porém quando adicionado ao meio SOF, 20 mM de glicose, o desenvolvimento até blastocisto foi maior em baixas tensões de oxigênio, assim como, quando utilizados 20 mM de glicose ao meio TCM 199 o desenvolvimento até blastocistos foi menor em baixa tensão de oxigênio.

Estes dados indicam a modificação do metabolismo quando o oócito é submetido *in vitro* à baixas tensões de oxigênio. Leivas *et al.*, (2006) não encontraram diferença na taxa de clivagem, produção embrionária e na taxa de prenhez quando os oócitos obtidos *in vivo* foram maturados, fecundados e cultivados em 5% ou 20% de O₂. Khurana & Niemman (2000) também não encontraram diferenças na produção embrionária nestas condições de MIV. Atualmente muitas equipes de PIV em escala comercial realizam a MIV enquanto transportam os oócitos do local da OPU para o laboratório. Este processo é conduzido em atmosfera com 5% de O₂ e apresenta bons índices de desenvolvimento embrionário. No entanto, Pinyopummintr & Bavister (1995) demonstraram que quando a maturação é conduzida em 5% de O₂, o consumo de oxigênio pelas células do *cumulus oophorus* deixa a concentração abaixo do que é requerido pelo oócito. Essa concentração abaixo da requerida pode afetar a fosforilação oxidativa e conseqüentemente a geração de ATP, prejudicando assim a maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário precoce (Silva *et al.*, 2010), devido à degeneração celular por falta de ATP no citoplasma (Gottardi & Mingotti, 2009). Pereira *et al.* (2010), demonstraram que existe efeito da fonte proteica ou de macromolécula utilizada e da tensão de oxigênio na MIV, sendo que com 20% de O₂ os melhores resultados obtidos foram com soro fetal bovino (SFB) enquanto que com 5% de O₂ os melhores resultados foram com a substituição do SFB por álcool polivinílico (PVA).

2.3 Densidade de Oócitos na Maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

A Produção *in vitro* de embriões bovinos é influenciada pelo número de oócitos ou embriões cultivados por gota. Em trabalhos de pesquisa a origem dos oócitos geralmente é de ovários de fêmeas de abatedouros, enquanto que para fins comerciais a principal fonte de oócitos é através da aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU), sendo neste caso, o número de oócitos coletados muito variável entre doadoras. Devido a esta variação no número de oócitos obtidos por aspiração entre doadoras torna-se essencial adequar o volume de meio para diferentes quantidades de oócitos (Brum *et al.*, 2005).

O cultivo de oócitos em grupos tem efeito benéfico no desenvolvimento até o estágio blastocisto, devido à produção de fatores parácrinos (Donnay *et al.*, 1997). O'Doherty *et al.*, (1995) relatam que oócitos e embriões cultivados individualmente resultam em uma menor produção de blastocistos em relação aos cultivados em grupo. Neste mesmo trabalho, os autores relatam que grupos formados por um maior número de oócitos produzem uma maior taxa de blastocistos e com um maior número de células que os grupos compostos por menos

oócitos. Brum *et al.*, (2005) em seu estudo com diferentes densidades de oócitos por volume de meio de maturação, relataram que não houve diferença na clivagem e produção de embriões, quando utilizados grupos de 10 ou de 20 oócitos, porém grupos de 5 oócitos apresentaram uma menor produção embrionária no dia 7 após a fecundação. Neste mesmo estudo o volume de meio utilizado não teve efeitos na clivagem e nem na produção embrionária, porém quando a MIV foi realizada na condição de 1µl de meio para 1 oócito, a taxa de eclosão no dia 9 após a FIV foi menor que as outras proporções de oócito/meio(1:5µl e 1:10µl).

As células do *cumulus* apresentam efeito benéfico sobre a MIV, pois contribuem para a formação do pró-núcleo masculino e posterior desenvolvimento do embrião (Chian *et al.*, 1994). É sabido que uma alta concentração de células do *cumulus* pode gerar competição pelo oxigênio (Pinyopummintr & Bavister, 1995) reduzindo a disponibilidade do mesmo para o oócito (Konish *et al.*, 1996.). Sabe-se também que a disponibilidade de oxigênio é diminuída em baixas tensões (2%; Silva *et al.*, 2010) podendo ser resultado da competição entre as células do *cumulus* e o oócito pelo O₂ disponível. Estudos da interação de diferentes tensões de oxigênio com outros fatores (meio de cultivo ou fonte protéica) durante a maturação já são descritos na literatura (Castro e Paula *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2010), entretanto o efeito da interação da tensão de oxigênio e a densidade de oócitos ainda não foram relatados.

2.4 Estresse Oxidativo

As altas concentrações de oxigênio são tóxicas para células de mamíferos, devido a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS; Umaoka *et al.*, 1992) que pode determinar o estresse oxidativo. Nos oócitos, as espécies reativas de oxigênio são importantes mediadores da sinalização intracelular, sendo responsáveis por numerosas funções celulares em condições fisiológicas (Goud *et al.*, 2008; Ray *et al.*, 2012). São formadas na membrana da mitocôndria durante a fosforilação oxidativa e geração de ATP (Feugang *et al.*, 2004). Danos oxidativos ocorrem nas células quando as ROS reagem com os lipídios celulares, proteínas e ácidos nucleicos (Devine *et al.*, 2012). As principais ROS produzidas são o ânion superóxido(O₂^{•-}), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila (OH[•]). As ROS tem habilidade de reagir com outras moléculas e células, oxidando-as, podendo resultar em uma alteração morfológica e funcional da célula (Agarwal *et al.*, 2006). Estas alterações podem ser evidenciadas por alterações na integridade celular, viabilidade e função dos gametas e embriões, pois afetam diretamente a dinâmica dos processos de maturação e divisão celular (Goud *et al.*, 2008).

Entre as alterações que o acúmulo de grandes quantidades de ROS pode causar na célula estão: mutações, inativação ou perda do DNA mitocondrial, síntese ou estocagem de proteínas anormais ou oxidadas e modificações na composição lipídica das membranas. (Goud *et al.*, 2008). Para controle das ROS, a célula possui um sistema de defesa, que consiste na produção de antioxidantes. Estes são classificadas em antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Entre os enzimáticos destacam-se a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e a catalase. Entre as defesas não-enzimáticas destacam-se a glutatona (GSH), alfa-tocoferol e o ácido ascórbico (Cetica *et al.*, 2001). Quando a SOD atua no processo de controle das ROS, ela age no anion superóxido, transformando-o em peróxido de hidrogênio, que posteriormente será neutralizado pela catalase e pela GPx, esta última que tem sua função ativada pela GSH (Fig. 4; Meister, 1988).

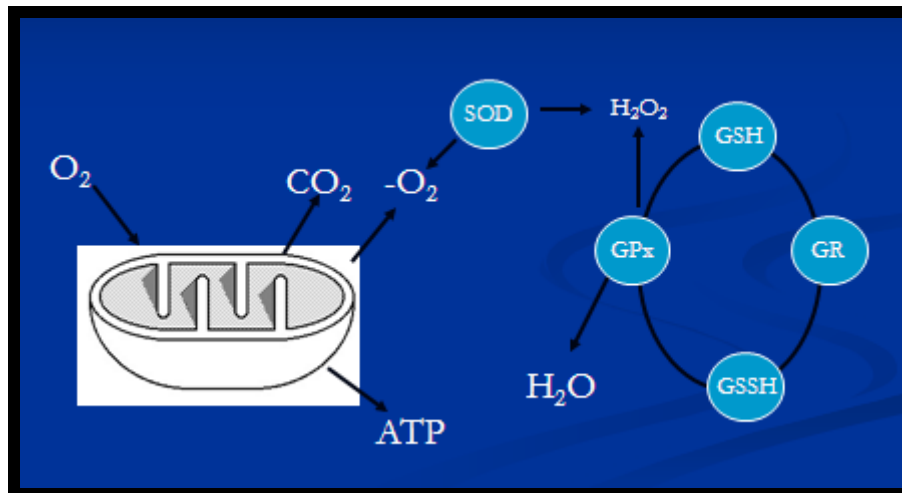


Figura 4: Esquema da produção de espécies reativas de oxigênio pelo metabolismo da mitocôndria e controle das ROS pelo sistema antioxidante da célula.

A GSH é um importante antioxidante não enzimático, estando presente nos oócitos em níveis variáveis. Após o período de maturação do oócito, os níveis de GSH aumentam significativamente, sendo reduzidos após a fecundação (Funahashi *et al.*, 1995; Matos e Furnus, 2000). Trabalhos já demonstraram em suínos, hamsters e ratos que a GSH apresenta um importante papel na proteção do oócito contra danos oxidativos e também na formação do pró-núcleo masculino após a penetração espermática (Ali *et al.*, 2003) com um papel importante na descondensação do espermatozoide (Matos e Furnus, 2000).

Alguns estudos sugerem que a concentração de ROS são maiores em cultivos celulares sob tensão de 20% de oxigênio quando comparado à tensão de 5% O₂ (Gigli *et al.*, 2006; Guerin *et al.*, 2001 Hashimoto *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 1998; Fowler *et al.*, 1978). Em gametas, o estresse oxidativo pode causar alterações no processo de MIV, como o retardo da maturação nuclear e falha na maturação citoplasmática (Goud *et al.*, 2008). No entanto, nos meios de MIV existe componentes como o soro, que possuem substâncias que atuam como antioxidantes, minimizando estes efeitos. Resultados recentes mostram que a MIV sob baixa tensão de O₂ com a presença de soro resulta em diminuição das taxas de maturação e posterior desenvolvimento embrionário (Pereira, *et al.*, 2010). Outro trabalho realizado por Mingoti *et al* (2011), demonstrou que oócitos maturados em 20% de oxigênio apresentaram uma maior taxa de metáfase II. Estes resultados sugerem que em baixas tensões de oxigênio pode ocorrer indisponibilidade de O₂ ao oócitos permitindo a instalação do estresse oxidativo. A interação entre a tensão de oxigênio e a densidade de oócitos pode alterar a disponibilidade de oxigênio já que existe competição pelo oxigênio entre os oócitos e também entre oócitos e as células do *cumulus oophorus*, portanto essa interação pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, induzindo ao estresse oxidativo, causando danos celulares e influenciando nas taxas de fecundação *in vitro* e desenvolvimento embrionário.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a influência da tensão de oxigênio e da densidade de oócitos por volume de meio utilizada na MIV sobre a maturação e a fecundação *in vitro* de oócitos bovinos.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência da tensão de 5% ou 20% de O₂ e da densidade de oócitos (1:10 ou 1:20) utilizada na MIV, sobre a maturação citoplasmática e nuclear de oócitos bovinos maturados *in vitro*.
- Avaliar a influência da tensão de 5% ou 20% de O₂ e da densidade de oócitos (1:10 ou 1:20) utilizada na MIV, sobre a produção de espécies reativas ao oxigênio e a atividade antioxidante nos oócitos e no meio de MIV.
- Avaliar a influência da tensão de 5% ou 20% de O₂ e da densidade de oócitos (1:10 ou 1:20) utilizada na MIV, sobre as taxas de penetração, fecundação e de polispermia de oócitos bovinos fecundados *in vitro*.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. As seções *Materiais e Métodos*, *Resultados*, *Discussão dos Resultados* e *Referências Bibliográficas* encontram-se no próprio artigo. O artigo está apresentado da mesma forma que será submetido ao periódico *Theriogenology*.

**THE OXYGEN TENSION AND OOCYTE DENSITY ON *IN VITRO* MATURATION
AFFECT THE *IN VITRO* FERTILIZATION OF BOVINE OOCYTES**

A.B. Giotto¹; D.S. Brum¹; F.W. Santos¹; A.C.G. Guimarães¹; C.G.M Gonçalves¹;

C.I.U. Machado¹; A.B. Moyses¹; N. Folchini¹; F.G. Leivas¹

¹ Federal University of Pampa (UNIPAMPA), BIOTECH, Lab Biotechnology of
Reproduction, 97.500-970, Uruguaiana, RS, Brazil.

* Corresponding author. Rod. BR 472, Km 587, Cx. Postal 118 - 97.500-970, Tel/fax.:
+555534134321. E-mail: fabioleivas@unipampa.edu.br (F.G. Leivas)

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of the association of oxygen tensions (5% or 20%) with different oocyte density in IVM of bovine oocytes on maturation and fertilization rates, ROS production and antioxidant activity. Three experiments were performed with bovine oocytes obtained slaughterhouse ovaries. After selection the oocytes were randomly distributed in 4 treatments: 1:10/5%; 1:10/20%; 1:20/5% and 1:20/20%. In experiment I, nuclear maturation status and cytoplasmic maturation were similar among treatments ($P>0.05$). In experiment II, ROS production and antioxidant activity were analyzed in oocytes and IVM medium after 24 h of maturation. Reactive oxygen species in oocytes were higher in treatments with low oxygen tension (1:10/5% and 1:20/5%) independently of oocyte density ($P<0.05$). Additionally, ROS levels in IVM medium were higher in treatments with high oocyte density by volume of medium (1:10/5%; 1:10/20%) independently of oxygen tension ($P<0.05$). The GSH levels and SOD activity were similar among treatments ($P>0.05$). In Experiment III, fertilization and penetration rates were higher in treatment with 20% oxygen tension and high oocyte density (1:10; $P<0.05$). Furthermore, high incidence of polyspermy was observed on groups with high oxygen tension and low oocyte density (1:20/20%; $P<0.05$). Therefore, data from present study provide evidence of an interaction between oxygen tension and oocyte density on IVM, influencing the *in vitro* fertilization

process. In conclusion both oxygen tensions can be used during IVM. The results of this study show an interaction between oxygen tension and oocyte density which increase the ROS production in certain associations and subsequently influencing the rates of *in vitro* fertilization of bovine oocytes.

Keywords: *In vitro* maturation; ROS production; oxygen tension; oocyte density; *in vitro* fertilization.

1. Introduction

The *in vitro* maturation (IVM) of bovine oocytes has an important role to *in vitro* embryo production. The nuclear maturation rates in oocytes matured *in vitro* can be about 90% [1], but only 30-35% of the matured oocytes reach the blastocyst stage. However, following *in vivo* maturation and subsequent *in vitro* fertilization (IVF), which this rates increase to 60-80% [2,3] which indicates that oocyte maturation is the key factor affecting blastocyst development. Therefore, improvements in the conditions of IVM would be useful to enhance blastocyst production. Many factors have interference on IVM, like oocyte quality, IVM medium, atmospheric conditions and oocyte density that the IVM are conducted.

The most common atmospheric tension used for IVM is 5% CO₂, which means 20% O₂. This tension is higher than tension that are observed on female reproductive tract and follicular fluid, which range between 1.3 and 8.5% O₂ [4,5]. The oxygen tension has an important role to cell activity in many cell types, like, oocytes, somatic cells, stem cells and embryos [6]. Great variability of results was found on the use of 5 or 20% oxygen tension during IVM. Some studies showed that lower oxygen tension (5%) on IVM had a higher embryo production [7,8,9] while other studies report detrimental effects [10,11,12]. In swine the lower oxygen tension had a better embryo production [13], Adam *et al.* [14] showed in

mouse oocytes better cleavage rates in 5% of O₂, but no difference on blastocyst rates. In humans both 5 and 20% oxygen tension have been used for IVM [15]. Leivas *et al.* [16] did not find difference on rates of cleavage, blastocyst and pregnancy when the bovine oocytes were matured, fertilized and cultured in 5 or 20% oxygen tension. Neither, Khurana and Niemman [17] found difference in embryo production using low or high O₂ tension during IVM.

Another factor that can influence the IVM is the oocyte density by volume of medium. Currently, using oocytes from slaughterhouse ovaries the number of oocytes during IVM is constant, but with advancement of Ovum Pick-Up (OPU) the number of oocytes during IVM is variable due to factors like breed of the donor (*Bos taurus X Bos indicus*), physiological condition or stage of estrous cycle. When the oocytes are cultured in groups the rates of blastocyst are better than cultured single or in groups of less than 10 oocytes [18,19]. However, high oocyte density can increase the competition by cumulus cells and oocyte by oxygen [10] and can affect its availability necessary for the oocyte to complete maturation. Another fact that can interfere on oocyte maturation is excessive production of reactive oxygen species (ROS) increased by high oxygen tension (20%) [8,20,21,22]. An inadequate association of oxygen tension and oocyte density can contribute to increase of ROS and can induce oxidative stress. ROS in physiologic levels on oocyte have an important role on cell activity, but when in excess, the ROS can cause several cell damage [23]. For regulation of ROS, the cell has an antioxidant system, which is based on enzymatic and non-enzymatic protection [24]. An imbalance of ROS production and antioxidant system, develop the oxidative stress. The non-enzymatic protection can protect the oocyte from oxidative damages and on male pro nucleous formation during fertilization [25]. Oxidative stress can also affect the mechanism of calcium release [23], that regulates the reorganization of cortical granules [26] and directly influence the process of fertilization. The interaction of oxygen tension with

different factors that affects the maturation dynamics have been studied; however the interaction of oxygen tension and oocyte density is not reported. This interaction may cause an increase of ROS levels and subsequently affect the rates of fertilization and embryonic development. The aims of this study are evaluate the effect of IVM on different oxygen tension (5 or 20%) and different oocyte density by volume of medium (1:10 or 1:20) on the bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*.

2. Materials and Methods

All the reagents and chemicals utilized on this study were acquired from Sigma Aldrich (St. Louis MO, USA). Other fonts of the reagents and chemicals will be cited.

2.1 Oocyte recovery and selection

The oocytes used in this study were recovered from bovine ovaries collected on a slaughterhouse and transported to laboratory in a 0,9% NaCl solution plus streptomycin, potassic benzilpenicillin and procaine benzilpenicilin (Agrovet, 500.000, Novartis, Eurofarma Laboratórios, Brazil). The 2 – 8mm follicles were aspirated with 18g needle on a vacuum pump and selected quality 1 and 2 oocytes [27].

2.2 In vitro maturation

The oocytes were matured in TCM 199 medium plus 10% of estrous mare serum (EMS)[28], 100 µg/ml of epidermal growth factor (EGF), 50µg/ml of LH (Lutropin, Bioniche, Ontario, Canada), 5µg/ml of FSH (Folltropin, Bioniche, Ontario, Canada) and 22

mg/ml of pyruvate. The oocytes were maintained on maturation medium for 22-24 hours, in incubator at 39°C according treatment.

2.3 *In Vitro Fertilization*

After the IVM period, the oocytes were washed in TCM HEPES and transferred to a dish containing 300µl of FERT medium [29], plus 6mg/ml of bovine serum albumin (BSA), 10 µg/ml of heparin, 20µM of penicilamin, 10µg of hipotaurin and 2µM of epinefrin.

The sperm were selected by separation with different density gradients, were utilized densities of Percoll of 90, 60 and 30% [30]. A commercial semen of *Bos taurus taurus* bull were utilized for the fertilization.

After the sperm selection the drops with the oocytes were inseminated with 2×10^6 spz/ml and they were co-incubated for 18 hours at 39°C, saturated humidity in 5% of CO₂ in air.

2.4 *Cytoplasmic maturation evaluation*

Denuded oocytes were co-incubated for 30 min with Mitotracker Green FM (MT; Molecular Probes INC, USA) on concentration of 250nm on TCM 199 HEPES and were evaluated on fluorescence microscope with 490nm of excitation and 516nm of emission. For the cytoplasmic maturation (CM) the mitochondrial reorganization assay according Stojkovic *et al*, [31] was used. It was considered oocytes with CM, the oocytes that presented the mitochondrial dispersed and distributed in homogeneous form in the cytoplasm. Were considered without mitochondrial reorganization the oocytes had the localization of the mitochondrial on the cytoplasm periphery or the oocytes that had vacuoles in the cytoplasm.

2.5 Nuclear Maturation Evaluation

Denuded oocytes were incubated with 10µg/ml of bisbenzimidazole (Hoescht 33342) and evaluated under fluorescence microscope with 365nm of excitation and 410nm of emission. Were considered oocytes with nuclear maturation the oocytes that had the extrusion of first polar body. The oocytes without the first polar body were not considered matured.

2.6 Evaluation of the production of Reactive oxygen species

After the 24 hours of IVM, the oocytes were denuded and washed in TCM HEPES and transferred to 100 µl of TrisHCl, pH 7.4 and stored at -20° C. When all replications were finished, the samples were evaluated. Reactive oxygen species levels in oocytes and in maturation medium, after IVM period were determined by spectrofluorimetric method, utilizing 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA) [32]. The samples were incubated with 10µl of DCHF-DA (1mM) on dark. The DCHF-DA oxidation to fluorescent dichlorofluorescein was the marker for ROS detection. The intensity emission of fluorescence was 520nm with excitation of 480nm, 30 minutes after add DCHF-DA on the medium.

2.7 Evaluation of GSH levels and SOD activity

After the 24 hours of IVM, the oocytes were denuded, washed in TCM HEPES and three times in free Mg²⁺/ CL₂ PBS. Groups of 15 oocytes were frozen in 60µl of PBS plus PVP at -20° C and thawed at room temperature for three times, to give a total cell disruption [33].

The GSH levels were determined by spectrofluorimetric method [8,34] using o-phthalaldehyde (OPA) as fluorophore. Oocyte sample (10 μ l) was incubated with 10 μ l of OPA (0.1% in methanol) and 180 μ l of 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) for 15 min at room temperature in dark. Fluorescence was measured with a Hidex Plate Chameleon V Multitechnology Platereader (425-156 Model) at excitation wavelength of 350 nm and at emission wavelength of 420 nm. GSH levels were expressed as nmol GSH/mL.

Superoxide dismutase activity was measured with a method based on the ability of SOD to inhibit the auto-oxidation of epinephrine to adrenochrome [24,35]. The colour reaction can be monitored at 480 nm. One enzymatic unit (1 UI) is defined as the amount of enzyme necessary to inhibit the auto-oxidation rate in 50% at 26 °C.

2.8 Evaluation of In Vitro Fertilization

After 18 hours of co-incubation of the oocytes and spermatozoa was performed the evaluation of fertilization. To evaluation was utilized 10 μ g/ml of bisbenzimidazole (Hoescht 33342) under a epifluorescent microscope with 365nm of excitation and 410 of emission. The fertilization was evaluated by pro nucleous formation, sperm penetration with or without decondensation and polysperm rates. Were considered fertilized oocytes, those that had two pro nucleous formation and extrusion of the second polar body; or those had the extrusion of the second polar body and one sperm in decondensation. The penetration was considered the zygotes that had only one penetrate sperm. The polyspermy was measured by two or more penetrate sperm [36].

2.9 Statistical Analyses

Percentages of nuclear and cytoplasmic maturation status were based on the number of matured oocytes on total of evaluated oocytes, these data were analyzed by ANOVA and Tukey test. For ROS production were utilized ANOVA and Tukey test to analyze the units of fluorescence of oocytes and in maturation medium. All data were analyzed on the software STATISTICA '99 Edition (StatSoft, Inc. 1999). Data of fertilization evaluation were analyzed by Z test. The level of significance was of 5%.

2.10 Experimental Design

This study was performed in three experiments where bovine oocytes were matured on different oxygen tension (5 or 20%) associated with different density of oocyte by volume of medium (1:10 or 1:20 oocytes:microliter). The Experiment I was performed to evaluate the nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes, the Experiment II evaluated the ROS production and the antioxidant system of the oocyte and Experiment III evaluated the *in vitro* fertilization.

In all experiments the oocytes were obtained from slaughterhouse bovine ovaries selected according to De Loss *et al.*[27] and distributed randomly on each treatment: **Treatment 1:10/5%:** 1 oocyte per 10 μ l of IVM medium in 5% of O₂ (1:10 μ l in 5% O₂); **Treatment 1:10/20%:** 1 oocyte per 10 μ l of IVM medium in 20% of O₂ (1:10 μ l in 20% O₂); **Treatment 1:20/5%:** 1 oocyte per 20 μ l of IVM medium of IVM medium in 5% of O₂ (1:20 in 5% O₂); **Treatment 1:20/20%:** 1 oocyte per 20 μ l of IVM medium in 20% of O₂ (1:20 in 20% O₂).

2.11 Experiment I - Evaluation of nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes *in vitro* matured on different oxygen tension and different oocyte density.

Were performed nine replication for nuclear and cytoplasmic maturation assay (435 and 420 oocytes respectively). For each treatment, 24 hours after maturation, were performed nuclear and cytoplasmic maturation evaluation.

2.12 Experiment II - Evaluation of ROS production in oocytes and in IVM medium, and evaluation of antioxidant system in oocytes n vitro matured on different oxygen tension and different oocyte density.

The ROS production in oocytes and ROS accumulation on IVM medium after 24 hours of maturation were evaluated by spectrofluorimetric method. Glutathione and Superoxide dismutase were also evaluated in all treatment by spectrofluorimetric method (GSH) and by a method based on epinefrin auto oxidation (SOD) For ROS production was utilized 420 oocytes (Seven replications) and for antioxidant system evaluation were utilized 360 oocytes (Six replications).

2.13 Experiment III - IVF evaluation of oocytes in vitro matured on different oxygen tension and different oocyte density.

On this experiment were realized seven replications of the IVF of oocytes (n=331) after 24 hours of IVM, to determinate the influence of these IVM systems on the fertilization, penetration and polyspermy rates.

3. Results

3.1 Experiment I: Evaluation of Nuclear and Cytoplasmic maturation of bovine oocytes in vitro matured

The nuclear maturation rates did not differ among treatments (1:10/5%=70.54%, 1:10/20%=72.64%, 1:20/5%=67.29% and 1:20/20%=68.18%). All the treatments have around 70% of cytoplasmic maturation rates (1:10/5%=71.04%, 1:10/20%= 73.91%, 1:20/5%=69.23% and 1:20/20%=72.03%). Similar percentages were obtained when nuclear and cytoplasmic maturation were evaluated.

3.2 Experiment II: Evaluation of ROS production in oocytes and in IVM medium and antioxidant system in oocytes in vitro matured.

3.2.1. Production of reactive oxygen species

The production of reactive oxygen species in oocytes matured on 5% O₂ atmosphere were higher than oocytes matured on 20% O₂ atmosphere (FIG. 1). Oocyte density by volume of medium did not show any interference on ROS production by oocytes. On the other hand, the ROS accumulation in the medium was higher in treatments with density of 1 oocyte to 10 µl of IVM medium than the treatments with density of 1 oocyte to 20 µl of IVM medium, regardless of the oxygen tension utilized on IVM (FIG. 1).

3.2.2. Antioxidant System Evaluation

There was no difference in the GSH levels and SOD activity (P>0.05). The levels of GSH in oocytes were on 1:10/5% (7.43±1.42 nmol GSH/mL), 1:10/20% (7.21±1.95nmol

GSH/mL), 1:20/5% (7.48 ± 0.89 nmol GSH/mL) and 1:20/20% (5.7 ± 0.82 nmol GSH/mL) whereas SOD activity was on 1:10/5% (18.16 ± 5.00 UI), 1:10/20% (19.46 ± 3.00 UI), 1:20/5% (23.64 ± 4.23 UI) and 1:20/20% (24.01 ± 1.58 UI).

3.3 Experiment III: IVF evaluation of oocytes *in vitro* matured on different systems.

Significantly differences were observed on normal fertilization (NF), polyspermic penetration (PP) and normal fertilization plus normal penetration (PFN). Normal Penetration (NP) rates were not different among treatments ($P > 0.05$). Fertilization rates were higher when 20% oxygen tension was associated with high oocyte density than the 5% oxygen tension and high oocyte density (Tab. 1). The use of 20% oxygen tension associated with a lower oocyte density had higher polyspermic penetration rates than oocytes matured under 20% oxygen tension and high density. Normal Penetration and normal fertilization data showed that the association of 20% oxygen tension and high oocyte density (1:10/20%) had higher rates than other treatments (1:10/5% and 1:20/20%) however it was similar to treatment 1:20/5%. (Tab 1)

4. Discussion

The IVP of bovine embryos has been studied around the world to develop a better system to production of blastocysts. The IVM is one of the critical points in *in vitro* blastocyst production. In cattle, beneficial [8,9] and detrimental [10,11,12,37] effects of low oxygen tension during IVM have been reported, but, the effect of the density of oocytes associated with oxygen tension has not been studied. Nevertheless, an optimal oxygen level for IVM has not been established and the standard oxygen tension continues to be 20% O₂.

Our results showed that the oxygen tension and density of oocytes during IVM did not affect the rate of nuclear maturation and cytoplasmic maturation. However, showed variation in the ROS production and fertilization rates of these oocytes providing evidence of the influence of these factors on *in vitro* fertilization. The nuclear and cytoplasmic maturation rates (70 and 71%) in Experiment I did not differ among treatments independent of oxygen tension (5 or 20%) or density of oocytes by volume of medium (1:10 or 1:20), showing that these systems of IVM did not affect the maturation process. Mingoti *et al* [38] showed that 20% O₂ tension on IVM improves rates of metaphase II. However, in most cases even with this high rate of *in vitro* maturation only 30-35% of the matured oocytes reach the blastocyst stage [2,3], which indicates that others factors are affecting the oocyte maturation and future embryo development. It is known that the nuclear maturation and reorganization of mitochondria are essential for successful fertilization; however another factor like reorganization of cortical granules and mitochondria activity, have to be analyzed to give conclusive rates of oocyte maturation.

High oxygen tension (20%) in culture conditions may cause increases in the generation of ROS [8, 20,21,22]. It is know that the ROS when are on physiological levels are beneficial for many cellular function [23] and to control ROS production the cell have a defense system, consisting on a production of antioxidants. This study showed in Experiment I, that 5% oxygen tension produced more ROS in oocytes than 20% oxygen tension, independently of oocyte density utilized. The higher production of ROS in lower oxygen tension can be explained by the competition of oocytes and cumulus cells by the available oxygen [10]. In systems with low oxygen tension may lack oxygen for the energy generation and cause an imbalance of ROS production and antioxidant defense [39]. These data were confirmed when evaluated the ROS production on IVM medium the system that had a higher concentration of oocytes by volume of medium (1: 10µl) accumulated more ROS than the

systems that were utilized lower oocyte density (1:20 μ l), independently of oxygen tension utilized.

The maturation of bovine oocytes can be influenced by oxidative stress, that can cause several cell damage[40] like abnormal DNA segregation, mutations, inactivation of mitochondrial DNA, synthesis or storage of abnormal proteins, modification on lipid composition of membrane and affecting the maturation process [23]. The GSH is synthesized during maturation, increasing activity after IVM [41]. Cetica *et al.* (2001) [24] showed decrease in SOD activity after maturation.

In our study in Experiment II, were evaluated oxidative stress indicators, like GSH levels and SOD activity after maturation, showing that these parameters did not change in the oocytes. Despite the increased production of ROS in parameters did not change in the oocytes. Despite the increased production of ROS in treatments with 5% O₂, we cannot say that the levels found were sufficient to generate an oxidative stress, since the GSH levels and SOD activity were not altered. In swine, the low oxygen tension does not increase GSH concentrations [42]. The fact that parameters such as nuclear and cytoplasmic maturation and antioxidant defenses (GSH e SOD) did not differ among treatments does not mean that there were no other changes in the oocyte, since these parameters are only reduced after a series of biochemical events that may occur in cells, for example, the action of ROS on the cell membrane. The ROS may be affecting the other systems of maturation like the reorganization of cortical granules and activity of mitochondria for ATP generation that are closely connected with the fertilization rate [39]. During the IVM, the release Ca⁺⁺ mechanisms are activated [43], and the reorganization of cortical granules is affected by oxidative stress [23]. The polysperm rates are higher on treatment that was used 20% of oxygen and low oocyte density, even though treatment with lower ROS production, suggests that the production of beneficial ROS may being insufficient and found wanting in the reorganization of cortical

granules, that function is avoid polysperm [44]. In experiment III, the fertilization and penetration rates were affected by association of oxygen tension and oocyte density by volume of medium. The results showed that 20% oxygen tension associated with 1:10 μ l oocyte density was better than the others treatments, showing that the oxygen tension and oocyte density on IVM affect the fertilization. The ROS production on 20% oxygen tension was lower than 5% of O₂ and when are associated with a high oocyte density the development of fertilization did not affected by accumulated ROS on IVM medium. On the other hand, lower oocyte density associated with a low oxygen tension did not affect the fertilization rates. The interaction of oxygen tension and factors that affects the maturation, fertilization and embryo development, like media and glucose, protein source on IVM of bovine oocytes[11, 46] and on IVM of swine oocytes [45] have been reported. This study are related that the interaction of oxygen tension and oocyte density affects the ROS production in oocytes and the *in vitro* fertilization of bovine oocytes. Data from present study provide evidence of an interaction between oxygen tension and oocyte density on IVM, influencing further *in vitro* fertilization process. The interaction between oxygen tension and oocyte density utilized during IVM period, do not affect the maturation rates. Additionally certain associations of these factors cause an increased production of reactive oxygen species, which in turn affect the *in vitro* fertilization of bovine oocytes. Better rates of IVF are obtained when IVM is conducted on 20% of oxygen tension and high oocyte density.

5. References

- [1] Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP. Oocytes and embryo quality: effect of origin culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Domest Anim* 2003; 38(4):259-67.

- [2] Blondin P, Bousquet D, Herménégilde T, Barnes F, Sirard MA. Manipulation of follicular developmental to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol Reprod* 2002; 66(1):38-43
- [3] Rizos D, Lonergan P, Boland M.P, Arroyo-García R, De La Fuente J, Gutiérrez-Adán A, Analyses of messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocysts quality. *Biol Reprod* 2002; 66(3):589-595.
- [4] Mastroianni LJ, Jones R. Oxygen tension within the rabbit fallopian tube. *J Reprod Fertil* 1965; 9:99-102.
- [5] Banwell KM, Lane M, Russell DL, Kind KL, Thompson JG. Oxygen concentration during mouse oocyte maturation affects embryo and fetal development. *Hum Reprod* 2007; 22(10):2768-75.
- [6] Hirao Y, Shimizu M, Iga K, Takenouchi N. Optimization of oxygen concentration for growing bovine oocytes in vitro: Constant low and high oxygen concentration compromise the yield of fully grown oocytes. *J Reprod Dev* 2012; 58(2):204:11
- [7] Miller GF, Rorie RW. Effect of oxygen concentration during oocyte maturation on subsequent bovine embryo cleavage and development in vitro. *Research Series – Arkansas Agricultural Experiment Station* 2000; 478:43-44.
- [8] Hashimoto S, Minami N, Takakura R. Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. *Mol Reprod Dev* 2000; 57(4):353-360.
- [9] Hashimoto S. Application of in vitro maturation to assisted reproductive technology. *J.Reprod Dev* 2009; 55(1), 1–10.
- [10] Pinyopummintr T, Bavister BD, Optimum gas atmosphere for in vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 1995; 44(4): 471-477.

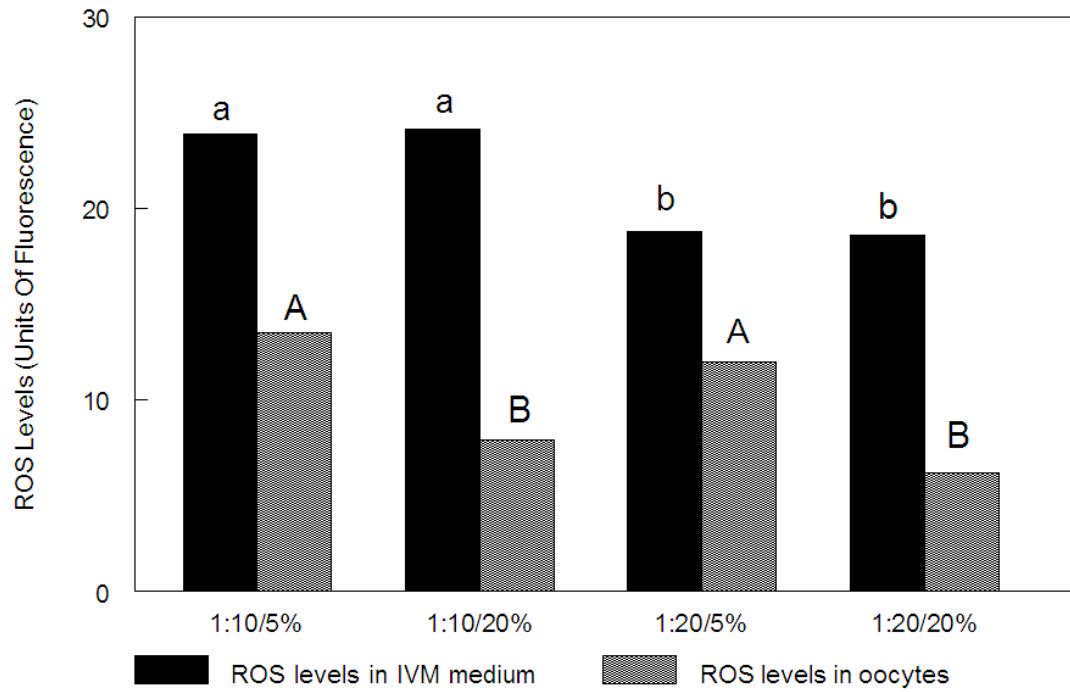
- [11] De Castro E Paula LA, Hansen PJ. Interactions between oxygen tension and glucose concentration that modulate actions of heat shock on bovine oocytes during in vitro maturation. *Theriogenology* 2007; 68(5):763-770.
- [12] Hansen PJ. To be or not to be—determinants of embryonic survival following heat shock. *Theriogenology* 2007; 68(1):40–48.
- [13] Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T. Effects of oxygen concentration on the in vitro development ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology* 2004; 62(7):1186–97.
- [14] Adam AAG, Takahashi Y, Nagano SKM. Effects of oxygen tension in the gas atmosphere during in vitro maturation, in vitro fertilization and in vitro culture on the efficiency of in vitro production of mouse embryos. *Jp J Vet Res* 2004; 52(2):77-84
- [15] Bermejo – Alvarez P, Lonergan P, Rizos D, Gutiérrez-Adan A. Low oxygen tension during IVM improves bovine oocyte competence and enhances anaerobic glycolysis. *Reprod BioMed* 2010; 20(3):341– 349
- [16] Leivas FG, Brum DS, Saliba WP, Alvim TT, Bernardi ML, Rubin MIB, Silva CAM. Oxygen tension in the IVM and IVF of bovine oocytes: Effect on the embryonic development and pregnancy rate. *Anim Reprod* 2006; 3:439-445.
- [17] – Khurana NK, Niemann H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology* 2000; 54(5):741-756.
- [18] O’doherly EM, Wade MG, Hill JL, Bolland MP. Effects of culturing bovine oocytes either single or in groups on development to blastocysts. *Theriogenology* 1997; 48(1):161-169
- [19] Brum DS, Leivas FG, Silva CAM, Rubin MIB, Rauber LP, Fialho SS, Bernardi ML. The effects of the number of oocytes and the volume of maturation medium in bovine in vitro embryo production. *Anim Reprod* 2005; 2:70-73.

- [20] – Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod* 1998; 13(4):998-1002.
- [21]- Guérin P, Mouatassim S, Ménézo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod* 2001; 7(2):175-189.
- [22]- Fowler CJ, Callingham BA, Substrate selective activation of rat liver mitochondrial monoamine oxidase by oxygen. *Biochem Pharmacol* 1978; 27(16):1995-2000.
- [23]- Goud AP, Goud PT, Diamond MP, Gornik B, Abu-Soud HM. Reactive oxygen species and oocyte aging: Role of superoxide, hydrogen peroxide and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 2008; 44(7):1295–1304.
- [24] – Cetica PD, Pintos LN, Dalvit GC, Beconi MT, Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation. *IUBMB Life* 2001; 51(1):57-64
- [25] – Alli AA, Biloudeau JF, Sirard MA. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology* 2003; 59(3-4):939-949.
- [26] –Abbott AL, Ducibella T. Calcium and the control of mammalian cortical granule exocytosis. *Front Biosci* 2001; 6:792-806.
- [27] - DE Loos F, Van Vliet C, Van Maurik P, Kruip, TA, Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res* 1989; 24(2):197-204.
- [28] Figueiró GM, Leivas FG, Rauber LP, Filho MFS, Teichmann CE, Mezzalira A, Rubin MIB, Mondino CAS. Produção in vitro de embriões bovinos com soro de égua ou de vaca em estro com ou sem a adição de LH/FSH. *Ciência Rural* 2004; 34(2):479-484.
- [29] Parrish JJ, Susko PJJ, Liebfried RML, Crister ES, Eyestone WH, First NL. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1986; 25(4):591-600;

- [30] Folchini NP, Leivas FG, Santos FW, Schwengber DR, Martin DM, Spiazzi CC, Brum DS. Uso de Mini Percoll modificado para seleção e redução da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em espermatozoides bovinos. *Rev Bras Reprod Anim* 2012; 36(4):239-244.
- [31] Stojkovic M, Machado S, Stojkovic P, Zakartchenko V, Hutzler P, Gonçalves P, Wolf E. 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 of Reprod* 2001, 64(3):904-909
- [32] Loetchutinat C, Kothan S, Dechsupa S, Meesungnoen J, Jay-Gerin JP, Makhetskorn S. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. *Radiat. Phys. Chem* 2005; 72:323-331.
- [33] De Matos DG, Furnus CC. The importance of having glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: Effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 2000; 53(3):761-771.
- [34] Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976; 74(1):214-226
- [35] Misra H, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247(10):3170-75.
- [36] Xu KP, Greve T. A detailed analysis of early events during in-vitro fertilization of bovine follicular oocytes *J Reprod Fert* 1988, 82(1):127-134
- [37] Watson AJ, De Souza P, Caveney A, Barcroft LC, Natale D, Urquhart J, Westhusin ME. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number and apoptosis. *Biol. Reprod.* 2000; 62(2):355-64.

- [38] Mingoti GZ, Castro VSDC, Méo SC, Barreto LSS, Garcia JM. The effects of macromolecular and serum supplements and oxygen tension during bovine in vitro procedures on kinetics of oocyte maturation and embryo development. *In Vitro Cell Dev Biol Animal* – 2011;47(5-6):361-7
- [39] Silva CGM, Faustino LR, Saraiva MVA, Rossetto R, Figueiredo, J.R. Influencia da tensão de oxigênio na maturação oocitária e cultivo in vitro de folículos e embriões. *Rev Bras Reprod Anim* 2010; 34(4):233-242.
- [40] Agarwal A, Said TM, Bedaiwy MA, Banerjee J, Alvarez JG. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil and Steril*. 2006 86(3):503-512.
- [41] Myamura M, Yoshida M, Hamano S, Kuwayama M. Glutathione concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes. *Theriogenology* 1995; 43:282 abstract
- [42] Bing YZ, Hirao Y, Che M, Iga K, Takenouchi N, Kuwayama M, Fuchimoto D, Martinez HR, Nagai T. In vitro maturation and glutathione synthesis of porcine oocytes in presence or absence of cysteamine under different oxygen tensions: role of cumulus cells. *Reprod, Fertil and Dev* 2002; 14(3-4):124-131.
- [43] Wang WH, Sum QY, Hosoe M, Shioya Y, Day BN. Quantified analysis of cortical granulae distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. *Biol Reprod* 2003; 56(6):1376-82.
- [44] Wessel GM, Brooks JM, Green E, Haley S, Voronina E, Wong J, Zaydfudim V, Conner S. The biology of cortical granules. *Int Rev Cit* 2001; 209:117-206.
- [45] Takahashi Y, First N L. In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 1992; 37(5): 63-978.
- [46] Pereira MM, Machado MA, Serapiao RV, Viana JHM, Camargo LSA. Effect of oxygen tension and serum during ivm on developmental competence of bovine oocytes *Reprod Fertil Dev* 2010, 22:1074-82

[47] Marques MG, De Barros FRO, Goissis MD, Cavalcanti PV, Viana CHC, Assumpção MEOD, Visintin JA. Effect of low oxygen tension atmosphere and maturation media supplementation on nuclear maturation, cortical granules migration and sperm penetration in swine in vitro fertilization. *Reprod Dom Anim* 2012 47:491-497.



A, B, a, b: Different superscripts on the same colors bars show significantly difference. ($p < 0.05$)

Fig. 1: Reactive oxygen species production in oocyte and IVM medium after 24 hours of culture in 5 or 20 % of oxygen tension and 1:10 or 1:20 oocyte per microliter.

TABLE 1 - Percentages of normal fertilization (NF), normal penetration (NP), polyspermic penetration (PP), penetration and fertilization (PF) on oocytes matured *in vitro* using different oxygen tension and different oocyte density medium.

Treatment	Oocytes		NF		NP		PP		PFN	
	n		n	%	n	%	n	%	n	%
1:10/5%	88		16	18.1 ^b	10	11.4	19	21.6 ^{ab}	26	29.5 ^b
1:10/20%	82		29	35.4 ^a	11	13.4	11	13.4 ^b	40	48.8 ^a
1:20/5%	82		22	26.8 ^{ab}	11	13.4	15	18.3 ^{ab}	33	40.2 ^{ab}
1:20/20%	79		17	21.5 ^{ab}	6	7.6	22	27.8 ^a	23	29.1 ^b

^{ab} Within a column, means without common letter differed ($P < 0.05$).

* Percentage based on total of evaluated oocytes.

5. CONCLUSÕES

- A tensão de 5% ou 20% de O₂ e a densidade 1:10 ou 1:20 oócitos por microlitro de meio não afetam a maturação citoplasmática e a taxa de maturação nuclear.
- A tensão de 5% oxigênio na maturação *in vitro* causa uma maior produção de espécies reativas de oxigênio nos oócitos, independentemente da densidade de oócitos utilizada.
- A utilização da relação de 1 oócito para 10 microlitros de meio de MIV causa um maior acúmulo de ROS no meio de MIV.
- A tensão de 5% ou 20% de O₂ e a densidade 1:10 ou 1:20 oócitos por microlitro de meio não afetam os níveis de glutatona e a atividade da superóxido dismutase.
- Os melhores índices de fecundação se obtêm quando a maturação *in vitro* é conduzida sob tensão de 20% de O₂ e alta densidade de oócitos (1:10).

6. PERSPECTIVAS

Novos estudos serão conduzidos para a avaliação da reorganização dos grânulos corticais e também a avaliação da atividade mitocondrial, assim como avaliações do consumo de oxigênio pelos oócitos e disponibilidade real de oxigênio no meio de maturação.

Os efeitos destes sistemas de MIV sobre a produção e qualidade embrionária, bem como pela expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo e de substâncias antioxidantes devem ser avaliados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott AL, Ducibella T. Calcium and the control of mammalian cortical granule exocytosis. *Front Biosci* 2001; 6:792-806.
- Abeydeera LR. In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology* 2002; 57(1):257-273.
- Adam AAG, Takahashi Y, Nagano SKM. Effects of oxygen tension in the gas atmosphere during in vitro maturation, in vitro fertilization and in vitro culture on the efficiency of in vitro production of mouse embryos. *Jpn J Vet Res* 2004; 52(2):77-84.
- Agarwal A, Said TM, Bedaiwy MA, Banerjee J, Alvarez JG. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil Steril* 2006; 86(3):503-512.
- Alli AA, Biloudeau JF, Sirard MA. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology* 2003; 59(3-4):939-949.
- Banwell KM, Lane M, Russell DL, Kind KL, Thompson JG. Oxygen concentration during mouse oocyte maturation affects embryo and fetal development. *Hum Reprod* 2007; 22(10):2768-75.
- Bavister B, Squirrell J. Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. *Hum Reprod* 2000; 15(2):189-198.
- Bermejo – Alvarez P, Lonergan P, Rizos D, Gutiérrez-Adan A. Low oxygen tension during IVM improves bovine oocyte competence and enhances anaerobic glycolysis. *Reprod BioMed* 2010; 20(3):341– 349.
- Bevers MM, Dieleman SK, van den Hurk R, Izadyar F. Regulation and modulation of oocytes maturation in the bovine. *Theriogenology* 1997; 47:13-22.
- Bing YZ, Hirao Y, Che M, Iga K, Takenouchi N, Kuwayama M, Fuchimoto D, Martinez, HR, Nagai T. In vitro maturation and glutathione synthesis of porcine oocytes in presence or absence of cysteamine under different oxygen tensions: role of cumulus cells. *Reprod Fertil Dev* 2002; 14(3-4):124-131.
- Blondin P, Bousquet D, Herménégilde T, Barnes F, Sirard MA. Manipulation of follicular developmental to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol Reprod* 2002; 66(1):38-43.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod* 1982; 27(1):147-158.

- Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287:817–33.
- Brum DS, Leivas FG, Silva CAM, Rubin MIB, Rauber LP, Fialho SS, Bernardi ML, The effects of the number of oocytes and the volume of maturation medium in bovine in vitro embryo production. *Anim. Reprod* 2005; 2:70-73.
- Cetica PD, Pintos LN, Dalvit GC, Beconi MT, Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation. *IUBMB Life* 2001; 51(1):57-64.
- De Castro E Paula LA, Hansen PJ. Interactions between oxygen tension and glucose concentration that modulate actions of heat shock on bovine oocytes during in vitro maturation following heat shock. *Theriogenology* 2007; 68(5):40–48.
- De Loos F, Van Vliet C, Van Maurik P, Kruip TA. Morphology of. immature bovine oocytes. *Gamete Res* 1989; 24(2):197-204
- De Matos DG, Furnus CC. The importance of having glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: Effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 2000, 53(3):761-771.
- Devine PJ, Preeault SD, Luderer, U, Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity. *Biol Reprod* 2012. 86(2) 1-10.
- Dieleman SJ, Hendriksen PJM, Viuff D, Thomsen PD, Hyttel P, Knijn HM, Wrenzycki C, Kruip TA, Niemann H, Gadella BM, Bevers MM, Vos PL. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology* 2002. 57(1):5-20.
- Donnay I, Van Langendonck A, Auquier P, Grisart B, Vansteenbrugge A, Massip A, Dessy F. Effects of co-culture and embryo number on the in vitro development of bovine embryos. *Theriogenology* 1997. 47:1549 – 61.
- Eichenlaub-Ritter U, Wieczorek M, Lüke S, Seidel T. Age related changes in mitochondrial function and new approaches to study redox regulation in mammalian oocytes in response to age or maturation conditions. *Mitochondrion* 2011;11(5):783–96.
- Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PAAS. Maturação citoplasmática de oócitos bovinos: aquisição de competência para o desenvolvimento: *Rev Bras Reprod Anim* 2008, 32:172-181.
- Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PAAS. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 2009, 71(5):836-848.

- Feugang JM, Roover RD, Moens A, Léonard S, Dessy F, Donnay I. Addition of β-mercaptoethanol stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by peroxidant agents. *Theriogenology* 2004. 61(1):71-90.
- Figueiró, GM, Leivas FG, Rauber LP, Filho MFS, Teichmann CE, Mezzalira A, Rubin MIB, Mondino CAS. Produção in vitro de embriões bovinos com soro de égua ou de vaca em estro com ou sem a adição de LH/FSH. *Ciência Rural* 2004, 34(2): 479-484.
- Folchini NP, Leivas FG, Santos FW, Schwengber DR, Martin DM, Spiazzi CC, Brum DS. Uso de Mini Percoll modificado para seleção e redução da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em espermatozoides bovinos. *Rev Bras de Reprod Anim*, 2012, 36: 239-244.
- Fowler CJ, Callingham BA. Substrate selective activation of rat liver mitochondrial monoamine oxidase by oxygen. *Biochem Pharmacol* 1978, 27(16):1995-2000.
- Funahashi H. Polyspermic penetration in porcine IVM-IVF systems. *Reprod Fertil Dev* 2003, 15(3):167-77.
- Gonçalves PBD, Barreta MH, Sandri LR, Ferreira R, Antoniazzi AQ, Produção In Vitro de embriões Bovinos: O Estado da Arte. *Rev Bras Reprod Anim* 2007, 31: 212 – 217.
- Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. Ed. Cabi Publishing, Cambridge, USA, 2 ed. 2003
- Gottardi FP, Mingoti GZ, Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. *Rev Bras Reprod Anim* 2009, 33:82-94.
- Goud AP, Goud PT, Diamond MP, Gornik B, Abu-Soud HM. Reactive oxygen species and oocyte aging: Role of superoxide, hydrogen peroxide and hypochlorous acid. *Free Rad Biol Med* 2008, 44(7):1295–1304
- Guérin P, Mouatassim S, Ménéz Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod* 2001; 7(2):175-189.
- Hansen P.J. To be or not to be—determinants of embryonic survival following heat shock. *Theriogenology* 2007; 68(1):40–48.
- Hashimoto S, Minami N, Takakura R. Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. *Mol Reprod Dev* 2000, 57(4):353-360.
- Hashimoto S. Application of in vitro maturation to assisted reproductive technology. *J. Reprod. Dev* 2009; 55(1):1–10

- Hirao Y, Shimizu M, Iga K, Takenouchi N. Optimization of oxygen concentration for growing bovine oocytes in vitro: Constant low and high oxygen concentration compromise the yield of fully grown oocytes. *J Reprod Dev* 2012, 58(2):204-211.
- Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976, 74:214-226.
- Khurana NK, Niemann H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology* 2000, 54:741-756.
- Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T. Effects of oxygen concentration on the in vitro development ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology* 2004; 62:1186–1197.
- Leivas FG, Brum DS, Saliba WP, Alvim MTT, Bernardi ML, Rubin MIB, Silva CAM. Oxygen tension in the IVM and IVF of bovine oocytes: Effect on the embryonic development and pregnancy rate. *Animal Reproduction* 2006; 3:439-445.
- Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP. Oocytes and embryo quality: effect of origin culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Domest Anim*.2006; 38(4):259-267.
- Marques MG, De Barros FRO, Goissis MD, Cavalcanti PV, Viana CHC, Assumpção MEOD, Visintin JA. Effect of low oxygen tension atmosphere and maturation media supplementation on nuclear maturation, cortical granules migration and sperm penetration in swine in vitro fertilization. *Reprod Dom Anim* 2012; 47(3):491-497
- Mastroianni LJ, Jones R. Oxygen tension within the rabbit fallopian tube. *J Reprod Fertil* 1965; 9:99-102.
- Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 1988; 263:17205-08.
- Miller GF, Rorie RW. Effect of oxygen concentration during oocyte maturation on subsequent bovine embryo cleavage and development in vitro. *Research Series – Arkansas Agricultural Experiment Station* 2000; 478:43-44.
- Mingoti GZ, Castro VSDC, Méo SC, Barreto LSS, Garcia JM. The effects of macromolecular and serum supplements and oxygen tension during bovine in vitro procedures on kinetics of oocyte maturation and embryo development. *In Vitro Cell Dev Biol Animal* 2011; 47(5-6):361-367

- Misra H, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247:3170-75.
- Myamura M, Yoshida M, Hamano S, Kuwayama M. Gluthatione concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes. *Theriogenology* 1995; 43:282 abstract
- O'doherty EM, Wade M,G, Hill JL, Bolland MP. Effects of culturing bovine oocytes either single or in groups on development to blastocysts. *Theriogenology* 1997, 48: 161-169.
- Palma GA. *Biotecnologia de La Reproducción*. Ed Mar Del Plata, Cordoba, Argentina. 2 ed. 2008.
- Parrish JJ, Susko PJJ, Liebfried RML, Crister ES, Eyestone WH, First NL. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1986, 25(4):591-600.
- Pereira MM, Machado MA, Serapiao RV, Viana JHM, Camargo LSA. Effect of oxygen tension and serum during ivm on developmental competenceof bovine oocytes *Reprod Fertil Dev* 2010, 22:1074-1082
- Pinyopummintr T, Bavister BD. Optimum gas atmosphere for in vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 1995, 44(4): 471-477.
- Ray P, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cel Signal* 2012, 24:981-990.
- Rizos D, Lonergan P, Boland MP, Arroyo-García R, De La Fuente J, Gutiérrez-Adán A. Analyses of messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocysts quality. *Biol Reprod* 2002, 66(3):589-595.
- Silva CGM, Faustino LR, Saraiva MVA, Rossetto R, Figueiredo JR. Influencia da tensão de oxigênio na maturação oocitária e cultivo in vitro de folículos e embriões. *Rev Bras Reprod Anim* 2010, 34:233-242.
- Sirad MA, Desrosier S, Assidi M. In vivo and in vitro effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. *Theriogenology* 2007; 68(1):71-76.
- Sirard MA. Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* 2001, 55(6):1241-1254.
- Stojkovic M, Machado S, Stojkovic P, Zakartchenko V, Hutzler P, Gonçalves P, Wolf E. 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* 2001, 64(3): 904-909.
- Takahashi Y, First NL. In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 1992; 37(5): 63-978.

- Tarazona AM, Rodrigues JI, Restrepo LF, Oliveira-Angel, M. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro. *Reprod Domest Anim* 2006, 41(1):5-11.
- Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K, Mori T. Effect of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Mol Reprod Dev* 1992, 31:28-33.
- Van Blerkom J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion* 2011; 11(5): 797–813.
- Van Blerkom J.; Davis P.W.; Lee J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 1995; 10(2):415–424
- Van den Hurk R, Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 2005; 63(6):1717-51.
- Viana JHM. Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em 2011: mudanças e tendências futuras, *O embrião* 2012; 51:6-10.
- Wang WH, Sum QY, Hosoe M, Shioya Y, Day BN. Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. *Biol Reprod* 1997; 56(6):1376-82.
- Wang LY, Wang DH, Zou XY, Xu CM. Mitochondrial function on oocytes and preimplantation embryos. *J Zhejiang Univ Sci* 2009; 107:483–92.
- Wang WH, Sum QY, Hosoe M, Shioya Y, Day BN. Quantified analysis of cortical granulae distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. *Biol Reprod* 2003; 56(6):1376-82
- Watson AJ, De Souza P, Caveney A, Barcroft LC, Natale D, Urquhart J, Westhusin ME. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number and apoptosis. *Biol Reprod* 2000; 62(2):355-64.
- Wessel GM, Brooks JM, Green E, Haley S, Voronina E, Wong J, Zaydfudim V, Conner S. The biology of cortical granules. *International Rev Cito* 2001; 209:117-206.
- Xu KP, Greve T. A detailed analysis of early events during in-vitro fertilization of bovine follicular oocytes *J Reprod Fert* 1988, 82:127–134
- Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod* 1998, 13:998-1002.

ANEXO 1

Resumo publicado nos anais da XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. 30/8 a 02/09/2012 – Foz Do Iguaçu, PR, Brasil.

[Cod. Trabalho: 402]

PÔSTER: OPU-FIV/TE

EFFECTS OF OXYGEN TENSION AND OOCYTE DENSITY BY VOLUME OF MEDIUM ON NUCLEAR AND CYTOPLASMIC MATURATION OF BOVINE OOCYTES

ANGELO BERTANI GIOTTO; ANTÔNIO CARLOS GALARÇA GUIMARÃES; NATÁLIA PICOLI FOLCHINI; CIBELE GARCIA MOREIRA GONÇALVES; CECÍLIA ISABEL INÊS URQUIZA FALCÃO MACHADO; DANIELA DOS SANTOS BRUM; FÁBIO GALLAS LEIVAS. *BIOTECH - LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO - UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA (UNIPAMPA), URUGUAIANA - RS - BRASIL.*

keywords: oocytes; nuclear maturation; cytoplasmic maturation

Abstract:

The *in vitro* maturation (IVM) comprises the events of nuclear and cytoplasmic maturation, these events, which can be influenced by several factors, including oxygen tension and density of oocytes per volume of medium used for IVM. The objective of this study was to evaluate the influence of association between O₂ tension (5% or 20%) and different density of oocytes per volume of medium (1:10 or 1:20 ul) on the nuclear and cytoplasmic maturation. Oocytes were obtained from abattoir ovaries by aspiration of the follicles 2-8 mm. Following selection they were homogeneously divided into 15 oocytes by treatment T1: 1:10 in 5% O₂, T2: 1:10 in 20% O₂, T3: 1:20 in 5% O₂, T4: 1:20 to 20% O₂. The oocytes were matured in TCM 199 plus 10% of estrous mare serum, EGF, LH, FSH and pyruvate for 22 to 24 hours at a temperature of 39 C and saturated humidity. After IVM the cumulus cells were removed and desnuded oocytes were stained in drops of 5µl of IVM medium supplemented with 10ug/ml of bisbenzimidazole (Hoechst33342) and 220nM of Mitotracker Green FM and analyzed under an epifluorescent microscope. For the assessment of nuclear maturation (NM) was considered the extrusion of the first polar body and cytoplasmic maturation (CM) was considered the reorganization mitochondrial. It was considered oocytes with CM, the oocytes presented mitochondria dispersed and distributed in a homogeneous form in the cytoplasm. Means of each group were compared by ANOVA and Tukey's test, with significance of 5%. For nuclear maturation were evaluated 219 oocytes (4 replicantions) divided into four treatments, with rates of NM similar among treatments (67.9%, 74.5%, 66% and 67.8% for T1, T2, T3 and T4, respectively). For the cytoplasmic maturation 264 oocytes (5 replicantions) were evaluated, and the rate of CM also similar between treatments (69.7%, 76.6%, 71.2% and 72.1% for T1, T2, T3 and T4, respectively). These data show that the association of an atmosphere of 5% or 20% O₂ with a density of 1:10 or 1:20 oocytes per microliter of MIV medium did not influence the rate of nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes matured *in vitro*. These results do not exclude possible influences on future embryo quality and other studies should be conducted to evaluate the production of reactive oxygen species (ROS) in the IVM and IVP systems and its influence on the quality of embryos produced *in vitro*. Financial support: FAPERGS (1011575) and CNPq (501763/2009-0).

ANEXO 2

Resumo publicado nos anais da 39^a Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (IETS), January, 19-22/2013, Hannover, Germany.

254 EFFECTS OF OXYGEN TENSION AND OOCYTE DENSITY DURING *IN VITRO* MATURATION ON THE LEVELS OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN BOVINE OOCYTES AND MATURATION MEDIUM

A. B. Giotto^A, A. C. G. Guimarães^A, C. G. M. Gonçalves^A, N. P. Folchini^A, C. I. I. U. F. Machado^A, F. W. Santos^A, D. S. Brum^A and F. G. Leivas^A

^A Federal University of Pampa, Uruguaiiana, Rio Grande do Sul, Brazil

Reproduction, Fertility and Development 25(1) 274-275 <http://dx.doi.org/10.1071/RDv25n1Ab254>
Published: 4 December 2012

Abstract

The reactive oxygen species (ROS) produced by animal cells and at physiological levels are responsible for several cellular functions. However, when there is an imbalance between ROS production and the antioxidant system in the cell, oxidative stress occurs and causes severe cell damage. In oocytes, ROS can affect the dynamics of maturation and early embryo development processes. Oxygen tension and the density of oocytes by medium volume during *in vitro* maturation (IVM) can influence ROS production. The aim of this study was to evaluate the influence of the association between oxygen tension (5 or 20%) and different oocyte densities during IVM (1 : 10 or 1 : 20 oocytes μL^{-1} of medium) on the ROS levels in oocytes and medium. Bovine oocytes ($n = 420$) were obtained from slaughterhouse ovaries by aspiration of 2- to 8-mm follicles. Quality I and II oocytes (De Loss *et al.* 1989 Gamete Res. 24, 197–204) were homogeneously distributed into groups of 15 oocytes per treatment: Treatment (T) 1 = 1 : 10 in 5% of O_2 ; T2 = 1 : 10 in 20% of O_2 ; T3 = 1 : 20 in 5% of O_2 ; and T4 = 1 : 20 in 20% of O_2 . The oocytes were matured in TCM-199 supplemented with 10% oestrous mare serum, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of epidermal growth factor, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of LH, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of FSH, and 22 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of pyruvate for 22 to 24 h at 39°C, in 5% CO_2 and saturated humidity. To assay ROS production, denuded oocytes and 60- μL samples of IVM medium were evaluated by the spectrofluorometric method with 2'7'-dichlorofluorescein-diacetate, in which the fluorescence intensity emission was considered an indicator of ROS production and measured by a spectrofluorophotometer. The ROS production in oocytes and in IVM medium was expressed as units of fluorescence (UF); data were analysed by ANOVA and Duncan's test with a 5% level of significance. Seven replications were performed. In treatment groups T1 and T3, the ROS production in oocytes was higher ($P < 0.05$) than in oocytes of treatment groups T2 and T4 (13.53 and 18.78 UF *v.* 7.92 and 6.15 UF, respectively). The ROS production in IVM medium was higher in the T1 (23.86 UF) and T2 (24.12 UF) treatment groups than in the T3 (18.78 UF) and T4 (18.57 UF) treatment groups. These results suggest an increase in ROS production in IVM oocytes under a 5% O_2 atmosphere in relation to a 20% O_2 atmosphere, irrespective of the oocyte density by volume of IVM medium. On the other hand, the accumulation of ROS in IVM medium seemed higher when the oocyte density was 1 oocyte to 10 μL of IVM medium, independent of the oxygen tension used. A higher level of ROS in 5% O_2 tension may be caused by competition for O_2 between oocyte and cumulus cells, causing a reduction in O_2 levels and changing the availability of O_2 to energy generation in oocytes and consequently increasing ROS generation. In this respect, 5% O_2 during IVM may contribute to the onset of oxidative stress in oocytes, which may compromise fertilization and early embryo development. Further research is necessary to clarify esterase activity in oocytes and the addition of exogenous peroxidase to validate the assay. *Financial support: FAPERGS (1011575) and CNPq (501763/2009).*

ANEXO 3

Resumo aceito para publicação nos anais da XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE). 29/08 a 01/09/2013. Praia do Forte, BA, Brasil.

[Cod. Trabalho: 771]

PÔSTER: OPU-FIV/TE

THE OXYGEN TENSION AND OOCYTE DENSITY UTILIZED ON IVM AFFECTS IN VITRO FERTILIZATION RATES OF BOVINE OOCYTES

ANGELO BERTANI GIOTTO; CECILIA ISABEL INÊS URQUIZA FALCÃO MACHADO; CIBELE GARCIA MOREIRA GONÇALVES; ANTÔNIO CARLOS GALARÇA GUIMARÃES; ALINE BARROS MOYSES; DANIELE MISSIO; DANIELA DOS SANTOS BRUM; FÁBIO GALLAS LEIVAS. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA, URUGUAIANA - RS - BRASIL.

keyword: Oxygen tension;Oocyte density;IVF

Abstract:

The *in vitro* maturation (IVM) of bovine oocytes, have an important role to sucess of *in vitro* fertilization (IVF). Many factors can influence on the IVM events, including, oxygen tension and oocyte density by volume of medium. Inadaquate combination of these factors can do the ROS generation, affecting the fertilization and embryo development. The aim of this study was evaluate the influence of association of oxygen tension (5% or 20%) with different oocyte density by volume of medium (1:10 or 1:20ul) on the rates of *in vitro* fertilization in bovine oocytes. Bovine oocytes (n=331) were obtained from slaughterhouse ovaries, and after selection, they were randomly divided in 4 treatments: T1: 1:10 in 5% of O₂; T2: 1:10 in 20% of o₂; T3: 1:20 in 5% of O₂; T4 1:20 in 20% of O₂. The oocytes were matured in TCM 199 plus 10% of estrous mare serum, EGF, LH, FSH and piruvate for 22 to 24 hours in 39°C and saturated humidity. To IVF, the spermatozoa were separated by Percoll gradients (90, 60, 30%), and co-incubated with oocyte for 18 hours in 5% of CO₂ in air and saturated humidity, in FERT TALP medium. Before IVF period, cumulus cells were removed by successive pipetting, the presumptive zygotes were stained with Hoescht 33342 and the fertilization rates were evaluated by pro nucleus formartion and sperm penetration. The statistical analyses were performed by Z test, with 5% level of signficance. The normal fertilization (NF) of group T2 (35.37%) was higher than T1 (18.18%; P<0.05) and similar to T3 (26.83%; P>0.05) and T4 (21.52%; P>0.05). The normal penetration (NP) rates did not differ between treatments (P>0.05). When the rates of NF and NP were analysed in association, the T2 (48.78%) was higher than T1 (29,55%; P<0.05) and T4 (29,11%; P<0.05), but similar to T3 (40,24%; P>0.05)). These data show the system utilized on T2 (1:10 in 20% O₂) and T3 (1:20 in 5% of o₂) presented the better rates of IVF, suggesting that when utilized an higher oxygen tension (20%) it must be utilized a higher density of oocyte.(1:10). A lower oocyte density (1:20) requires a lower oxygen tension (5%). The rates of IVF are influenced by oxygen tension and oocyte density by volume of medium utilized on IVM. Finacial Suport: FAPERGS (1011575).

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

G511e Giotto, Angelo Bertani
Efeito da tensão de oxigênio e da densidade de oócitos na
maturação in vitro de oócitos bovinos e a relação com o
estresse oxidativo / Angelo Bertani Giotto.
61 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL, 2013.
"Orientação: Fábio Gallas Leivas".

1. Maturação in vitro. 2. Espécies reativas de oxigênio. 3.
Tensão de oxigênio. 4. Densidade de oócitos. 5. Fecundação in
vitro de bovinos. I. Título.