



Influência da tensão de oxigênio na maturação oocitária e cultivo *in vitro* de foliculos e embriões

(*Influence of oxygen tension in oocyte maturation and in vitro culture of follicles and embryos*)

C.M.G. Silva¹, L.R. Faustino, M.V.A. Saraiva, R. Rossetto, J.R. Figueiredo

Laboratório de Manipulação de Oócitos e Foliculos Ovarianos Pré-antrais - LAMOFOPA, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

¹Correspondência: gomesvet@hotmail.com

Resumo

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas naturalmente durante o metabolismo celular. Em condições *in vitro*, a produção destas substâncias é potencializada pela presença de altas tensões de oxigênio (O₂), gerando o estresse oxidativo. Esta condição pode ser prejudicial a diferentes processos fisiológicos, requeridos para o desenvolvimento normal de diferentes células e estruturas. Em gametas e embriões, os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio envolvem peroxidação dos lipídios das membranas, danos ao DNA e morte celular por apoptose ou necrose. Esta revisão destaca a importância da tensão atmosférica de O₂ no cultivo *in vitro* de foliculos, oócitos e embriões.

Palavras-chave: cultivo celular, estresse oxidativo, folículo, embrião oxigênio.

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) are produced naturally during cell metabolism. Under *in vitro* conditions, the production of these substances is enhanced in the presence of high tensions of oxygen (O₂) generating oxidative stress. This condition can be detrimental to various physiological processes required for normal development of different cells and structures. In gametes and embryos the deleterious effects of ROS involve lipid peroxidation of membranes, DNA damage and cell death by apoptosis or necrosis. This review highlights the importance of atmospheric tension of O₂ in the *in vitro* culture of follicles, oocytes and embryos.

Keywords: cell culture, follicle, embryo, oxidative stress, oxygen.

Introdução

Nas últimas décadas, várias pesquisas têm sido realizadas na área de reprodução animal visando aumentar o potencial reprodutivo de animais de alto valor zootécnico ou em vias de extinção. Nesse sentido, vêm sendo desenvolvidos inúmeros modelos de estudos a fim de elucidar os mecanismos que regulam a foliculogênese e seus principais eventos, incluindo a atresia (Fortune, 2003). Entre esses modelos, destaca-se o cultivo *in vitro* de foliculos pré-antrais, cujo principal objetivo é promover o desenvolvimento folicular inicial até a completa maturação do oócito. O crescimento, a maturação e a fecundação *in vitro* de oócitos oriundos de foliculos pré-antrais poderão maximizar a produção *in vitro* de embriões, além de consistirem importantes ferramentas para a elucidação dos mecanismos que regulam a foliculogênese desde sua fase inicial até a fase final (Figueiredo et al., 2008).

O desenvolvimento de um sistema de cultivo eficiente, entretanto, consiste hoje em um fator limitante para o sucesso do crescimento folicular inicial, fazendo-se necessária a padronização de importantes componentes, como o meio de cultivo, os fatores de crescimento e os hormônios que serão adicionados ao meio, bem como a atmosfera gasosa e, em particular, a tensão de oxigênio (O₂). Atualmente a concentração de O₂ tem recebido notável atenção, pois constitui um componente essencial para a manutenção da viabilidade e para os desenvolvimentos folicular e embrionário (Clark et al., 2006).

A presente revisão de literatura visa fornecer uma melhor compreensão sobre os aspectos relacionados à foliculogênese dos mamíferos, incluindo a população e atresia folicular, além de fornecer importantes informações sobre o desenvolvimento folicular, a maturação oocitária e o cultivo embrionário, com ênfase na tensão atmosférica de O₂.

Foliculogênese

A foliculogênese é um processo que se inicia com a formação do folículo primordial e culmina com o desenvolvimento do folículo de De Graaf, também conhecido como pré-ovulatório (Van den Hurk e Zhao, 2005). Durante esse processo, a morfologia folicular é alterada, uma vez que o oócito cresce e suas células circundantes se multiplicam e se diferenciam (Bristol-Gould e Woodruff, 2006). Dessa forma, a foliculogênese

pode ser dividida em duas fases distintas: 1) **fase pré-antral**, que é caracterizada pela ativação dos folículos primordiais e pela formação do folículo primário, com posterior transição destes folículos para secundários e 2) **fase antral**, caracterizada pelo surgimento de uma cavidade repleta de líquido denominada antro, bem como pelo crescimento dos folículos terciários e posterior diferenciação destes em folículos pré-ovulatórios (Fig. 1).

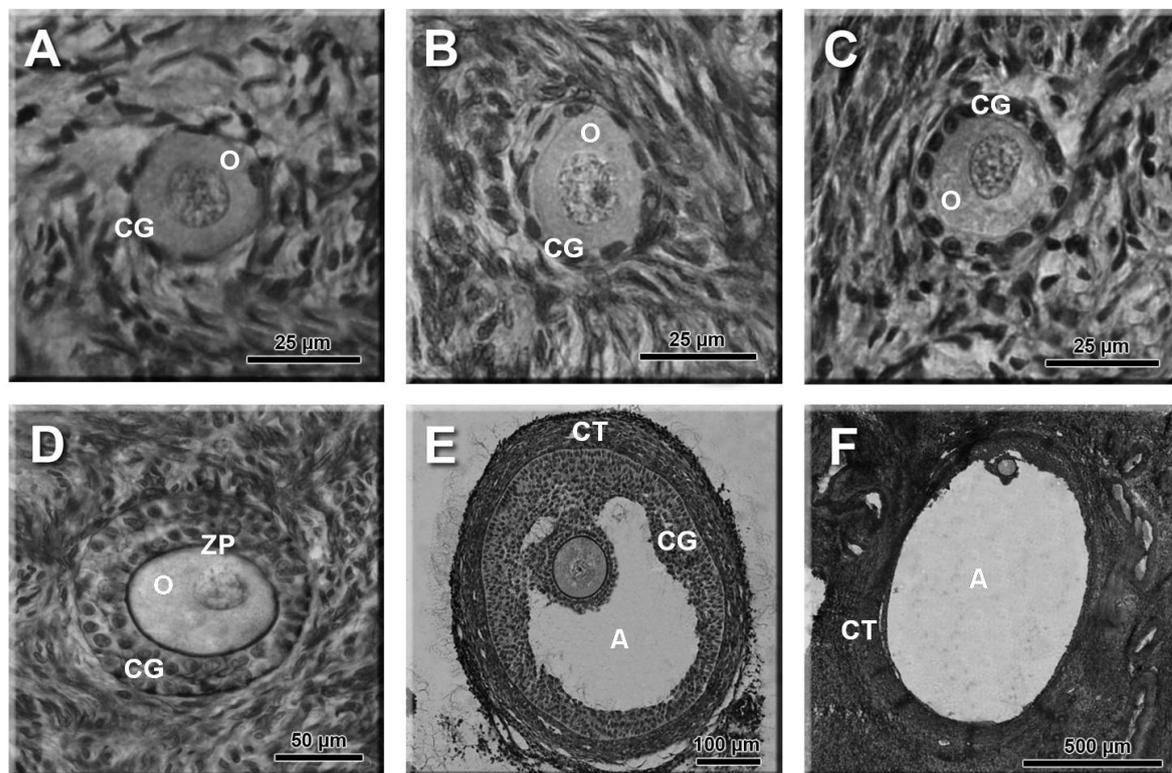


Figura 1. Cortes histológicas de folículos pré-antrais (A – primordial; B – transição; C – primário e D – secundário) e folículos antrais (E – terciário inicial e F – terciário avançado), após coloração com Ácido Periódico de Schiff (PAS)-Hematoxilina. O: oócito; CG: células da granulosa; ZP: zona pelúcida; CT: células da teca; A: antro.

Os folículos primordiais são constituídos de um oócito imaturo, circundado por uma simples camada de células da pré-granulosa de formato pavimentoso (Hutt et al., 2006). As características morfológicas que marcam a ativação destes folículos são o aumento do diâmetro oocitário, a proliferação das células da granulosa e a mudança na morfologia destas células de pavimentosas para cúbicas. Durante este período, os folículos que apresentam células da granulosa pavimentosas e cúbicas são denominados folículos de transição (Fortune, 2003). Em seguida, quando o oócito é circundado por uma camada completa de células da granulosa de morfologia cúbica, os folículos passam a ser denominados primários (Gougeon e Busso, 2000). Durante o crescimento destes folículos, as células da granulosa sofrem proliferação e ocorre um aumento do oócito em tamanho e conteúdo proteico (Picton et al., 1998). Posteriormente, duas ou mais camadas de células da granulosa são formadas ao redor do oócito, originando os folículos secundários. Nesta fase, ocorre a diferenciação das células do estroma em células da teca e é possível a visualização da zona pelúcida em torno do oócito (Fortune, 2003). Com o desenvolvimento dos folículos secundários e a organização das células da granulosa em múltiplas camadas, ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido denominada antro, que confere a classificação destes folículos antrais em terciários e pré-ovulatórios (Barnett et al., 2006).

Segundo Campbell (2009), grandes avanços foram obtidos nas últimas décadas com relação à biologia das células somáticas e germinativas de folículos ovarianos. A partir desses estudos, é notório que o desenvolvimento folicular parece ocorrer em três fases distintas, sendo a fase intermediária a mais prolongada. Na primeira, o desenvolvimento folicular ocorre na ausência de gonadotrofinas e parece ser controlado apenas pela expressão de fatores de crescimento locais. Na segunda fase, eles passam a ser responsivos, mas não requerem a presença de hormônios gonadotróficos para manter o desenvolvimento. Nesse momento, existe uma responsividade à ação das gonadotrofinas, entretanto a presença delas não é requerida para o crescimento normal. Já na terceira fase, existe uma alta dependência gonadotrófica para o desenvolvimento dos folículos antrais, que pode ser dividida em três etapas: recrutamento, seleção e dominância (Van den Hurk e Zhao, 2005), sendo a formação de folículos pré-ovulatórios um pré-requisito para a ovulação e posterior formação do corpo lúteo, bem como para a manutenção da fertilidade (Drummond, 2006).



População e atresia folicular

Os folículos pré-antrais representam 90% da população folicular, sendo que 95% deste total é constituído por folículos primordiais (Figueiredo et al., 2008), que constituem o estoque de gametas femininos (Liu et al., 2001). Segundo Katska-Ksiazkiewicz (2006), a população folicular difere entre as espécies, além de ser observada uma grande variação individual, sendo de aproximadamente 1.500 na camundonga (Shaw et al., 2000), 35.000 na cabra (Lucci et al., 1999), 160.000 na ovelha (Driancourt et al., 1991), 235.000 na vaca (Betteridge et al., 1989) e 2.000.000 na mulher (Erickson, 1986). Apesar da grande população folicular presente no ovário dos mamíferos, a maioria destes (cerca de 99,9%) não chega à ovulação, por um processo denominado atresia, o qual pode ocorrer por via degenerativa (necrose; Bras et al., 2005) e/ou apoptótica (Hussein, 2005).

Na via degenerativa, a isquemia pode ser uma das principais causas do desencadeamento da morte folicular (Farber, 1982), resultando em alterações na permeabilidade da membrana celular, aumento de água intracelular, vacuolização citoplasmática e, conseqüentemente, degeneração (Barros et al., 2001). Padaniham (2003) demonstrou que uma sobrecarga de íons Na^+ e um acúmulo de íons Ca^{2+} , com concomitante mudança na permeabilidade da membrana celular, os quais estão associados a modificações no volume e aumento na água intracelular, também podem levar ao processo necrótico. Além da isquemia, outros fatores que podem levar à degeneração são estímulos tóxicos, degenerativos e imunológicos, podendo tais fatores também induzir à apoptose (Zeiss, 2003).

No que concerne à via apoptótica, sabe-se que se trata de um evento geneticamente determinado, ou seja, depende da expressão de genes pró e antiapoptóticos. A característica marcante desse mecanismo é a fragmentação do DNA a cada 180-200 pares de bases (Hussein, 2005). Duas famílias importantes regulam o processo apoptótico: a família das caspases e a família Bcl-2 (Tibbets et al., 2003). Dentre os fatores que podem levar à apoptose, destacam-se o estresse oxidativo causado pelas espécies reativas de oxigênio, a irradiação, a ativação de genes promotores de apoptose, danos no DNA, as citocinas, as proteínas virais, bem como a deficiência de fatores de sobrevivência da célula (Johnson, 2003).

Cultivo folicular

O cultivo *in vitro* de folículos ovarianos é uma das etapas da biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA), ou ovário artificial, e vem sendo amplamente empregado com o intuito de avaliar o efeito de diferentes substâncias, em diferentes concentrações e em diferentes fases do desenvolvimento folicular, a fim de se mimetizar *in vitro* os eventos que ocorrem *in vivo* no ovário. Além disso, o cultivo folicular tem por objetivo fornecer um grande número de oócitos viáveis para posterior utilização em outras biotécnicas, como fecundação *in vitro*, visando à produção de embriões, transgenia e clonagem. Entretanto, para alcançar esses objetivos, é necessário o desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* ideal para cada etapa do desenvolvimento folicular.

Nas últimas duas décadas, vários sistemas de cultivo *in vitro* foram desenvolvidos, e os resultados foram dependentes do tipo de meio, do sistema de cultivo adotado, da espécie animal estudada, bem como da atmosfera gasosa utilizada (Eppig e Schoeder, 1989; Boland et al., 1993; Fortune, 2003). Apesar dos esforços, em animais domésticos, ainda não foi desenvolvido um sistema de cultivo adequado para promover o completo desenvolvimento de folículos pré-antrais iniciais (primordiais, de transição e primários) até o estágio de pré-ovulatório.

Nesse sentido, diversos estudos vêm sendo realizados a fim de se estabelecer a influência de diferentes fatores, como duração do cultivo, utilização de diferentes suplementos (Thompson et al., 1990), hormônios (Matos et al., 2007) e fatores de crescimento (Erickson, 2001), bem como diferentes regimes de troca de meio, sobre a elaboração de um sistema de cultivo adequado.

Os folículos pré-antrais podem ser cultivados inclusos no tecido ovariano, ou seja, *in situ*, ou na forma isolada. Em roedores, a pequena dimensão dos ovários possibilita o cultivo do órgão inteiro, o que tem sido bastante útil para o estudo da foliculogênese inicial em pequenas espécies de mamíferos (Fortune, 2003). Já em animais domésticos de médio e grande porte, devido às grandes dimensões dos ovários, não é possível a utilização deste modelo. O cultivo de pequenos fragmentos de córtex ovariano, rico em folículos primordiais, tem sido realizado para o estudo da ativação e do crescimento de folículos primordiais em diferentes espécies, como caprinos (Silva et al., 2006), ovinos (Andrade et al., 2005), bovinos (Braw-Tal e Yossefi, 1997) e humanos (Telfer et al., 2008). Esse sistema de cultivo tem como principal vantagem a manutenção da integridade folicular e das interações entre as células foliculares e do estroma, facilitando a perfusão do meio para o tecido ovariano (Telfer, 1996).

O cultivo de folículos isolados permite o monitoramento diário do crescimento folicular, bem como a análise do efeito *in vitro* de hormônios e fatores de crescimento sobre cada categoria folicular (Abir et al., 2001). Após o isolamento e posterior cultivo de grandes folículos secundários, foi obtida a formação de antro em ovinos (Cecconi et al., 1999), bovinos (Gutierrez et al., 2000) e caprinos (Huamin e Yong, 2000), bem como a maturação oocitária em ovinos (Tamilmani et al., 2005) e, mais recentemente, a produção de embriões em



bubalinos (Gupta et al., 2008) e suínos (Wu e Tian, 2007). Entretanto, o nascimento de produtos saudáveis a partir do cultivo de folículos pré-antrais e posterior maturação oocitária e fecundação *in vitro* foi relatado apenas em camundongos (O'Brien et al., 2003). É importante ressaltar que, para alcançar esses resultados, realizou-se apenas o controle da atmosfera do dióxido de carbono (CO₂) no interior da incubadora, não tendo sido verificada a influência do O₂.

Maturação oocitária

A maturação oocitária é uma etapa que sucede o cultivo folicular e define, de fato, o sucesso do desenvolvimento *in vitro* dos folículos ovarianos. Os oócitos dos folículos cultivados ou não encontram-se em prófase I, em condições *in vivo* somente após a fêmea atingir a puberdade, por ação hormonal, ocorre a retomada da meiose, que prossegue até alcançar a fase de metáfase II, estágio em que permanecem até a fecundação ou ativação partenogenética (Gonçalves et al., 2008). Semelhante ao que ocorre *in vivo*, a maturação *in vitro* envolve mudanças nucleares e citoplasmáticas do oócito, que devem ocorrer de forma simultânea de modo a capacitar a fecundação e possibilitar o desenvolvimento embrionário adequado (Dode et al., 2000).

Os eventos nucleares envolvem reorganização da rede de microtúbulos, rompimento do envoltório nuclear, condensação dos cromossomos e progressão para metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI), expulsão do primeiro corpúsculo polar e retenção no estágio de metáfase II (MII; Cha e Chian, 1998). Esses eventos são desencadeados por uma cascata de fosforilação e desfosforilação das enzimas quinases e fosfoquinases que atuam no fator promotor de maturação (MPF), responsável pela retomada e término da maturação dos oócitos em mamíferos (Gonçalves et al., 2007). O fator promotor de maturação apresenta baixa atividade quando o oócito está em fase de vesícula germinativa, ocorrendo um aumento gradativo da atividade deste fator no decorrer da meiose que atinge a atividade máxima no estágio de metáfase I (Gonçalves et al., 2008).

No que se refere às mudanças citoplasmáticas, ocorre reprogramação na síntese proteica, mudança na atividade do fator promotor de maturação, desenvolvimento dos mecanismos de liberação de Ca²⁺, aumento de deposição lipídica, redução do aparelho de Golgi, alinhamento dos grânulos da cortical próximos à membrana plasmática e expansão das células do *cumulus* (Dieleman et al., 2002).

Essa série de mudanças estruturais e bioquímicas representa o estágio final da preparação do oócito para a fecundação. Entretanto, para que isso ocorra, o oócito precisa ter competência meiótica, que pode ser definida como a habilidade do oócito em iniciar a meiose sob condições artificiais (Hewitt e England, 1998). Morfologicamente, os oócitos com maior potencial para retomada da meiose devem apresentar ooplasma homogêneo, serem completamente envolvidos por diversas camadas compactas de células do *cumulus* (Gonçalves et al., 2008) e apresentarem o diâmetro acima de 110 µm (Crozet et al., 2000).

Diversos estudos com animais domésticos têm demonstrado bons resultados no que se refere à aquisição de oócitos meioticamente competentes obtidos a partir de folículos pré-antrais (ovinos: Tamilmani et al., 2005; Arunakumari et al., 2007; suínos: Wu et al., 2001; bubalinos: Gupta et al., 2008). Entretanto, esses resultados ainda são bastante variáveis, possivelmente devido à natureza heterogênea dos oócitos imaturos utilizados para a produção *in vitro* de embriões (PIV), falta de controle da atmosfera gasosa (tensão de O₂) e componentes do meio de cultivo durante a maturação oocitária (Sirard, 2001).

Cultivo embrionário

Em procedimentos *in vitro*, após a fecundação, os embriões no estágio de uma célula ou zigoto são transferidos para o cultivo, onde permanecem por um período de sete dias, até atingirem o estágio de blastocisto, quando, então, podem ser transferidos para o útero de fêmeas receptoras que levarão a gestação a termo (Dode et al., 2000).

É sabido que a qualidade oocitária é um fator determinante para que embriões produzidos *in vitro* possam chegar ao estágio de blastocisto, contudo diversos estudos ressaltam que as condições de cultivo também são fatores preponderantes, influenciando, principalmente, a qualidade dos embriões (Loneragan et al., 2003). Essas condições de cultivo envolvem vários fatores, como o tipo de meio, a atmosfera gasosa, a densidade (quantidade de embriões/volume de meio), o tipo de suplementação proteica e a presença ou não de cocultivo (Donnay et al., 1997; Wrenzycki et al., 1999; Kitagawa et al., 2004; Oliveira et al., 2005).

Dentre esses fatores, um aspecto de grande importância no ambiente de cultivo embrionário é a atmosfera gasosa, especialmente a tensão de O₂, que tem grande influência na produção e na qualidade dos embriões, devido, principalmente, ao estresse oxidativo, que será destacado a seguir.

Implicações do oxigênio no cultivo celular *in vitro*

Citotoxicidade das espécies reativas de oxigênio

Alguns estudos sugerem que baixas tensões de O₂ podem ser inadequadas para sustentar o metabolismo celular aeróbio, enquanto o ambiente com alta concentração desse gás pode ser nocivo devido ao estresse

oxidativo causado pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO), que são produzidas naturalmente durante o metabolismo celular ou em desordens biológicas (Gigli et al., 2006).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção e a eliminação de radicais livres (Barreiros et al., 2006). De acordo com Mignotte e Vayssiere (1998), baixos níveis de espécies reativas de oxigênio podem induzir à apoptose, enquanto o acúmulo dessas moléculas pode gerar necrose em decorrência da peroxidação lipídica em diversas biomoléculas, ou, até mesmo, danos no DNA. Além disso, podem causar a oxidação de moléculas-chaves, liberando proteases, lipases e nucleases dentro das mitocôndrias, culminando com a morte celular (Fiers et al., 1999). As principais espécies reativas de oxigênio formadas durante a redução do O_2 são os radicais superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot ; Ferreira e Matsubara, 1997; Guérin et al., 2001), conforme demonstrado na Fig. 2.

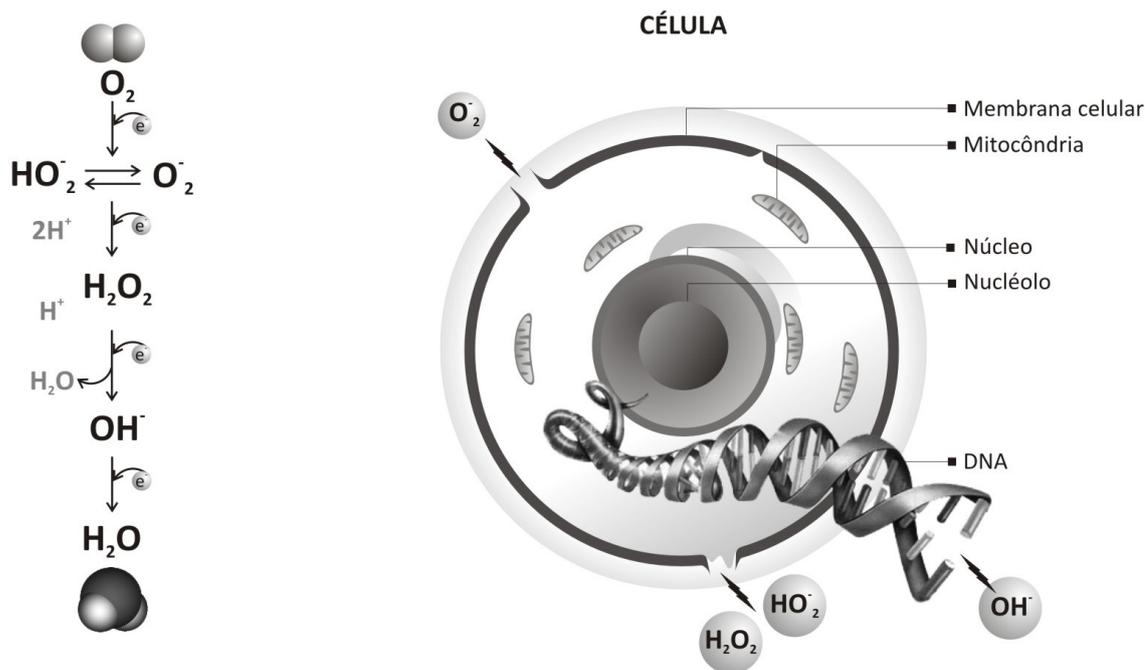


Figura 2. Espécies reativas de oxigênio (ERO) formadas a partir da redução do oxigênio (O_2) em água durante o metabolismo celular. Essas moléculas correspondem aos radicais superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila (OH^\cdot), que podem induzir à peroxidação lipídica de membranas biológicas a danos no DNA.

Segundo Barreiros et al. (2006), baixas concentrações das espécies reativas de oxigênio também podem atuar como segundo mensageiro, modulando a expressão de genes que governam processos fisiológicos em diferentes células e estruturas, como gametas e embriões. Entretanto, altas concentrações promovem diversos efeitos deletérios às funções celulares, podendo alterar várias moléculas, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Diversos estudos mostram que os desenvolvimentos folicular e embrionário são extremamente susceptíveis às injúrias causadas pelas espécies reativas de oxigênio durante o cultivo *in vitro* (Goto et al., 1993; Petersen et al., 2005; Redding et al., 2007; Silva et al., 2010). Nesse contexto, a concentração de O_2 tem recebido notável atenção por se mostrar um componente essencial para manutenção da viabilidade celular (Clark et al., 2006). Nas seções seguintes, serão enfatizados estudos que utilizaram diferentes tensões de O_2 para o desenvolvimento folicular, a maturação oocitária e o cultivo embrionário *in vitro*, bem como para a manutenção da viabilidade dessas estruturas.

Influência da tensão de oxigênio no desenvolvimento folicular

Além dos inúmeros aspectos já mencionados, os sistemas de cultivo *in vitro* visam amenizar os danos celulares causados pelas espécies reativas de oxigênio durante a manipulação e o cultivo folicular. Essas substâncias podem causar diversos danos, incluindo degeneração folicular, disfunções metabólicas e indução da apoptose ou necrose (Lima-Verde et al., 2007). Assim, diversos métodos têm sido desenvolvidos visando minimizar a formação das espécies reativas de oxigênio, dentre eles destacam-se a redução da tensão de O_2 nos sistemas de cultivo *in vitro*, redução do tempo de manipulação sob luz incandescente (estereomicroscópio), adição de antioxidantes ao meio de cultivo e realização de um cocultivo com células somáticas (Côrrea et al., 2008).

Especificamente, com relação à tensão de O_2 , poucos estudos relatam o efeito desse gás sobre o



desenvolvimento folicular em animais domésticos e em humanos. Sabe-se que, nos diferentes sistemas de cultivo de folículos e de embriões, a atmosfera gasosa normalmente utilizada é de 5% de CO₂ ou 20% de O₂. Entretanto, segundo Guérin et al. (2001), esta concentração de O₂ é mais elevada que a observada no ovário e no útero. De acordo com Barnett e Bavister (1996), a concentração intrauterina de O₂ está no intervalo entre 1,5 e 7%. Assim, uma menor tensão de O₂ tende a reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio, favorecendo o desenvolvimento folicular *in vitro* (Agarwal et al., 2005). Em folículos pré-antrais ovinos, Cecconi et al. (1999) demonstraram que baixos níveis de O₂ (5%) foram eficazes para aumentar as taxas de formação de antro após seis dias de cultivo. Por outro lado, observou-se que a tensão de 20% de O₂ estimulou o desenvolvimento de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos ovarianos bovinos (Gigli et al., 2006), além de aumentar significativamente a taxa de formação de blastocistos após o cultivo de oócitos suínos (Park et al., 2005). Na literatura, porém, ainda não há uma padronização sobre a concentração ideal de O₂ a ser utilizada no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais.

Influência da tensão de oxigênio durante a maturação oocitária

O O₂ que chega ao oócito é fundamental para o estabelecimento da competência meiótica e o subsequente desenvolvimento embrionário. Hashimoto et al. (2000) verificaram que a utilização de 5% de O₂ na maturação de oócitos bovinos reduziu significativamente a viabilidade oocitária, quando comparado à tensão de 20%. Já em suínos, os níveis de O₂ não exerceram efeitos na maturação de oócitos (Park et al., 2005). Segundo Banwell et al. (2007), em camundongas, diferentes concentrações de O₂ (2, 5 e 20%) não influenciaram a habilidade dos oócitos de retomarem à meiose e serem fecundados. Por outro lado, Preis et al. (2007) observaram nessa mesma espécie que a utilização de 5% de O₂ na maturação de oócitos favoreceu o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto em relação à concentração de 20%.

Em oócitos de humanos, bovinos e suínos, estudos têm sugerido que 2% de O₂ podem afetar a fosforilação oxidativa e conseqüentemente a síntese de ATP, além de apresentarem alta correlação com anormalidades cromossômicas e diminuição na taxa de gestação (Chui et al., 1997). Por outro lado, 20% de O₂ representam uma condição não fisiológica, possibilitando o aumento do estresse oxidativo durante a maturação, contribuindo, assim, para a ocorrência de alterações citogenéticas (Banwell et al., 2007). Dessa forma, apesar da grande variação nos resultados, concentrações intermediárias, por se aproximarem dos níveis fisiológicos, parecem ser as mais benéficas durante a maturação oocitária (Harvey, 2007).

Influência da tensão de oxigênio no desenvolvimento embrionário in vitro

A presença de elevados níveis de O₂ no cultivo aumenta as concentrações de espécies reativas de oxigênio, o que pode afetar drasticamente a qualidade embrionária (Harvey, 2007). Koerber et al. (1998) relataram que a incubação de embriões de coelhas por quatro horas sob 20% de O₂ induziu a alterações da expressão gênica, indicativo de altos níveis de estresse oxidativo. Outros estudos observaram ainda que a utilização de uma baixa tensão de O₂ (5%) aumentou significativamente a produção de embriões suínos (Kitagawa et al., 2004) e bovinos (Lonergan et al., 1999; Yuan et al., 2003), contraditoriamente ao observado em 20% de O₂.

Em suínos, Karja et al. (2004) verificaram que 5% de O₂ foram benéficos para o desenvolvimento *in vitro* de embriões até o estágio de blastocisto. Em outro estudo, Im et al. (2004) observaram, nesta mesma espécie, que o uso de 5% de O₂ no cultivo de blastocistos produzidos por transferência nuclear aumentou significativamente o número de células embrionárias (19,4 blastômeros) quando comparados com blastocistos produzidos em atmosfera contendo 20% desse gás (12,2 blastômeros).

Na espécie bovina, embriões em estágio precoce, quando cultivados sob baixas concentrações de O₂, apresentaram melhores taxas de desenvolvimento do que aqueles cultivados sob altas concentrações (Lequarre et al., 2003). Yuan et al. (2003) verificaram maior produção de células apoptóticas em embriões produzidos sob 20% de O₂, quando comparados com embriões produzidos sob 5%, sendo este um indicativo da qualidade dos embriões produzidos *in vitro*. Além disso, estudos em bovinos têm demonstrado que o desenvolvimento embrionário pode ser obtido com sucesso utilizando-se 5 ou 20% de O₂. Entretanto, quando a tensão de 20% de O₂ é utilizada, faz-se necessário realizar um cocultivo com células somáticas (Côrrea et al., 2008).

Acredita-se que essas células podem secretar substâncias embriotróficas ou remover compostos deletérios ao desenvolvimento embrionário. Ademais, as células somáticas podem facilitar o crescimento embrionário reduzindo os níveis de substâncias tóxicas (ERO) nas imediações do embrião (Khurana e Nieman, 2000).

Considerações finais

Conforme demonstrado, diversos sistemas de cultivo *in vitro* de folículos e embriões vêm tentando minimizar os efeitos tóxicos causados pela produção de espécies reativas de oxigênio por meio da utilização de



diferentes tensões de O₂, uma vez que as espécies reativas de oxigênio podem comprometer o desenvolvimento folicular, a maturação oocitária e a posterior produção *in vitro* de embriões. Entretanto, pode-se verificar que o conhecimento disponível, hoje, ainda não permite uma definição sobre a melhor tensão de O₂ a ser utilizada no cultivo *in vitro*, seja de complexo *cumulus*-oócitos, folículos ou embriões. Portanto, mais estudos são necessários para esclarecer a ação do O₂ e, assim, estabelecer um protocolo de maior eficiência, no que diz respeito à qualidade e ao desenvolvimento de folículos pré-antrais visando à produção *in vitro* de embriões em larga escala.

Referências

- Abir R, Fisch B, Nahun R, Orvieto E, Nitke S, Okon E, Ben-Rafael Z.** Turner's syndrome and fertility: Current status and possible future prospects. *Hum Reprod*, v.7, p.603-610, 2001.
- Agarwal A, Gupta S, Sharma RK.** Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*, v.3 p.28, 2005.
- Andrade ER, Seneda MM, Alfieri AA, Oliveira JA, Rodrigues APF, Bracarense L, Figueiredo JR, Tonioli R.** Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. *Theriogenology*, v.64, p.1104-1113, 2005.
- Arunakumari G, Vagdevi R, Rao BS, Naik BR, Naidu KS, Suresh Kumar RV, Rao VH.** Effect of hormones and growth factors on *in vitro* development of sheep preantral follicles. *Small Rumin Res*, v.70, p.93-100, 2007.
- Banwell KM, Lane M, Russell DL, Kind KL, Thompson JG.** Oxygen concentration during mouse oocyte maturation affects embryo and fetal development. *Hum Reprod*, v.22, p.2768-2775, 2007.
- Barnett DK, Bavister BD.** What is the relationship between the metabolism of preimplantation of embryos and their developmental competence? *Mol Reprod Dev*, v.43, p.105-133, 1996.
- Barnett KR, Schilling C, Greenfeld CR, Tomic D, Flaws JA.** Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Hum Reprod Update*, v.10, p.1-19, 2006.
- Barreiros ALBS, David JM, David JP.** Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nov*, v.29, p.113-123, 2006.
- Barros LF, Hermosilla T, Castro J.** Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. *Comp Biochem Physiol A*, v.130, p.401-409, 2001.
- Betteridge KJ, Smith C, Stubbings RB, Xu KP, King WA.** Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes. *J Reprod Fertil*, v.38, p.87-98, 1989.
- Boland NI, Humpherson PG, Leese JH, Gosden RG.** Pattern of lactate production and steroidogenesis during growth and maturation of mouse ovarian follicles *in vitro*. *Biol Reprod*, v.48, p.787-806, 1993.
- Bras M, Queenan B, Susin SA.** Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry*, v.70, p.231-239, 2005.
- Braw-Tal R, Yossefi S.** Studies *in vivo* and on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil*, v.109, p.165-171, 1997.
- Bristol-Gould S, Woodruff TK.** Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, v.66, p.5-13, 2006.
- Campbell BK.** The endocrine and local control of ovarian follicle development in the ewe. *Anim. Reprod*, v.6, p.159-171, 2009.
- Cecconi S, Barboni B, Coccia M, Mattioli M.** Development of sheep preantral follicles. *Biol Reprod*, v.60, p.594-601, 1999.
- Cha KY, Chian RC.** Maturation *in vitro* of immature human oocytes for clinical use. *Hum Reprod*, v.4, p.103-120, 1998.
- Chui DK, Pugh ND, Walker SM, Gregory L, Shaw RW.** Follicular vascularity the predictive value of transvaginal power Doppler ultrasonography in an *in vitro* fertilization programme: a preliminary study. *Hum Reprod*, v.12, p.191-196, 1997.
- Clark AR, Stokes YM, Lane M, Thompson JG.** Mathematical modelling of oxygen concentration in bovine and murine cumulus-oocyte complexes. *Reproduction*, v.131, p.999-1006, 2006.
- Côrrea AG, Rumpf R, Mundima TCD, Franco MM, Dode MAN.** Oxygen tension during culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Anim Reprod Sci*, v.104, p.132-142, 2008.
- Crozet N, Dahirl M, Gall L.** Meiotic competence of *in vitro* grown goat oocytes. *J. Reprod. Fertil*, v.118, p.367-373, 2000.
- 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*, v.57, p.5-20, 2002.
- Dode MAN, Adona PR, Rodovalho NCM.** Retenção da meiose de ovócitos bovinos em líquido folicular de folículos de vários tamanhos. *Arq Fac Vet UFRGS*, v.28, suppl., p.241, 2000. Resumo.
- 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*, v.47, p.1549-



1561, 1997.

Driancourt MA, Webb R, Fry RC. Does follicular dominance occur in ewe? *J. Reprod Fertil*, v.93, p.63-70, 1991.

Drummond AE. The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrinol*, v.4, p.1-11, 2006.

Eppig JJ, Schroeder AC. Capacity of mouse oocyte from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilization *in vitro*. *Biol Reprod*, v.41, p.268-276, 1989.

Erickson GF. An analysis of follicle development and ovum maturation. *Semin Reprod Endocrinol*, v.4, p.233-254, 1986.

Erickson GF. Role of growth factors in ovary organogenesis. *J Soc Gynecol Investig*, v.8, p.13-16, 2001.

Farber JL. Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. *Lab Invest*, v.47, p.114-123, 1982.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras*, v.43, p.61-68, 1997.

Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene*, v.18, p.7719-7730, 1999.

Figueiredo JR, Rodrigues APR, Amorim CA, Silva JRV. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2ª ed. São Paulo, SP: Roca, 2008. p.303-327.

Fortune JE. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.135-163, 2003.

Gigli I, Byrd DD, Fortune JE. Effects of oxygen tension and supplements to the culture medium on activation and development of bovine follicles. *Theriogenology*, v.66, p.344-353, 2006.

Gonçalves PBD, Barreta MH, Sandri LR, Ferreira R, Antoniazzi AQ. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.212-217, 2007.

Gonçalves PBD, Oliveira MAL, Mezzalira A, Montagner MM, Visitin JA, Costa LFS. Produção *in vitro* de embriões. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2.ed. São Paulo, SP: Roca, 2008. p.261-291.

Goto K, Noda Y, Mori T, Nakano M. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured. *Free Radic Biol Med*, v.15, p.69-75, 1993.

Gougeon A, Busso D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. *Mol Cell Endocrinol*, v.163, p.33-41, 2000.

Guérin P, Moutassim S, Ménéz Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod*, v.7, p.175-189, 2001.

Gupta PS, Ramesh HS, Manjunatha BM, Nandi S, Ravindra JP. Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. *Zygote*, v.16, p.57-63, 2008.

Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biol Reprod*, v.62, p.1322-1328, 2000.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 3.ed. New York, NY: Oxford University Press Inc, 1999.

Harvey AJ. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Anim Reprod Sci*, v.98, p.113-128, 2007.

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*, v.57, p.353-360, 2000.

Hewitt DA, England GCW. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation *in vitro*. *Anim Reprod Sci*, v.55, p.63-75, 1998.

Huamin Z, Yong Z. *In vitro* development of caprine ovarian preantral follicles. *Theriogenology*, v.54, p.641-650, 2000.

Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update*, v.11, p.162-178, 2005.

Hutt KJ, McLaughli, EA, Holland MK. KIT/KIT Ligand in mammalian oogenesis and folliculogenesis: Roles in rabbit and murine ovarian follicle activation and oocyte growth. *Biol Reprod*, v.75, p.42-433, 2006.

Im GS, Liangxue L, Liu Z, Hao Y, Wax D, Bonk A, Prather RS. *In vitro* development of preimplantation porcine nuclear transfer embryos cultured in different media and gas atmospheres. *Theriogenology*, v.61, p.1125-1135, 2004.

Johnson AL. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.185-201, 2003.

Karja NWN, Wongsrikeao P, Murakami M, Agung B, Fahrudin M, Nagai T, Otoi T. Effects of tension on the development and quality of porcine *in vitro* fertilized embryos. *Theriogenology*, v.62, p.1585-95, 2004.

Katska-Ksiazkiewicz L. Recent achievements in culture and preservation of ovarian follicles in mammals. *Reprod Biol*, v.6, p.3-16, 2006.



- 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*, v.54, p.741-756, 2000.
- Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T.** Effects of oxygen concentration and antioxidants on the developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology*, v.62, p.1186-1197, 2004.
- Koerber S, Navarrete SA, Tetens F, Kiichenhoff A, Fischer B.** Increased expression of NADH-Ubiquinone Oxidoreductase chain 2 (Ndr) in preimplantation rabbit embryos cultured with 20% oxygen concentration. *Mol Reprod Dev*, v.9, p.394-399, 1998.
- Lequarre AS, Marchandise J, Moreau B, Massip A, Donnay I.** Cell cycle duration at the time of maternal zygotic transition for *in vitro* produced bovine embryos: effect of oxygen tension and transcription inhibition. *Biol Reprod*, v.69, p.1707-1713, 2003.
- Lima-Verde IB, Bruno JB, Matos MHT, Rodrigues APR, Figueiredo JR, Oliveira MAL, Lima PF.** Implicações do estresse oxidativo no ovário e no embrião mamífero. *Med Vet*, p.81-88, 2007.
- Liu J, Van Der Elst J, Van Den Broeck R, Dhont M.** Live offspring by oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential *in vivo* transplantation and maturation. *Biol Reprod*, v.64, p.171-178, 2001.
- Loneragan P, O’Kearney-Flynn M, Boland MP.** Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. *Theriogenology*, v.51, p.1565-1576, 1999.
- Loneragan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP.** Oocytes and embryos quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Domest Anim*, v.38, p.259-267, 2003.
- Lucci CM, Amorim CA, Bão SN, Figueiredo JR, Rodrigues APR, Silva JR, Gonçalves PBD.** Effect of the interval of serial sections of ovarian in the *tissue chopper* on the number of isolated caprine preantral follicles. *Anim Reprod Sci*, v.56, p.39-49, 1999.
- Matos MHT, Lima-Verde IB, Bruno JB, Lopes CAP, Martins FS, Santos KDB, Rocha RMP, Silva JRV, Bão SN, Figueiredo JR.** Follicle stimulating hormone and fibroblast growth factor-2 interact and promote goat primordial follicle development *in vitro*. *Reprod Fertil Dev*, v.19, p.677-684, 2007.
- Mignotte B, Vayssiere JL.** Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem*, v.252, p.1-15, 1998.
- O’Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ.** A revised protocol for development of mouse oocyte from primordial follicles dramatically improves their development competence. *Biol Reprod*, v.68, p.1682-1686, 2003.
- Oliveira ATD, Lopes RFF, Rodrigues JL.** Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced *in vitro* under varying embryo density conditions. *Theriogenology*, v.64, p.1559-1572, 2005.
- Padanilam BJ.** Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am J Physiol-Renal*, v.284, p.608-627, 2003.
- Park JI, Hong JY, Yong HY, Hwang WS, Lim JM, Lee ES.** High oxygen tension during oocyte maturation improves development of porcine oocytes after fertilization. *Anim Reprod Sci*, v.87, p.133-141, 2005.
- Petersen A, Mikkelsen AL, Lindenberg GS.** The impact of oxygen tension on developmental competence of post-thaw human embryos. *Acta Obstet Gynecol Scand*, v.84, p.1181-1184, 2005.
- Picton H, Briggs D, Gosden R.** The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol*, v.145, p.27-37, 1998.
- Preis KA, Seidel GEJ, Gardner DK.** Reduced oxygen concentration improves the developmental competence of mouse oocytes following *in vitro* maturation. *Mol Reprod Dev*, v.74, p.893-903, 2007.
- Redding GP, Bronlund, JE, Hart AL.** Mathematical modelling of oxygen transport-limited follicle growth. *Reprod Res*, v.133, p.1095-1106, 2007.
- Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO.** Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, v.53, p.59-72, 2000.
- Silva CMG, Matos MHT, Rodrigues GQ, Faustino LR, Pinto LC, Chaves RN, Araújo VR, Campello CC, Figueiredo JR.** *In vitro* survival and development of goat preantral follicles in two different oxygen tensions. *Anim Reprod Sci*, v.117, p.83-89, 2010.
- Silva, JRV, Tharasanit T, Taverne MAM, van der Weijden GC, Santos RR, Figueiredo JR, Van den Hurk R.** The activin-follistatin system and *in vitro* early follicle development in goats. *J Endocrinol*, v.189, p.113-125, 2006.
- Sirard MA.** Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*, v.55, p.1241-1254, 2001.
- Tamilmani G, Rao BS, Vagdevi R, Amarnath D, Naik, BR, Mutharao M, Rao VH.** Nuclear maturation of oocytes in sheep preantral follicles cultured *in vitro*. *Small Rumin Res*, v.60, p.295-305, 2005.
- Telfer EE.** The development of methods for isolation and culture of preantral follicles from bovine and porcine ovaries. *Theriogenology*, v.45, p.101-110, 1996.
- Telfer EE, McLaughlin M, Ding C, Joo Thong K.** A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Hum Reprod*, v.23, p.1151-1158, 2008.
- Thompson JG, Simpson AC, Pugh PA, Donnelley PE, Tervit HR.** Effect of oxygen concentration on *in-vitro*



development of pre-implantation sheep and cattle embryos. *J Reprod Fertil*, v.89, p.573-578, 1990.

Tibbetts MD, Zheng L, Lenardo MJ. The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. *Nat Immunol*, v.4, p.404-409, 2003.

Van den Hurk R, Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v.63, p.1717-1751, 2005.

Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in pre-implantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Mol Reprod Dev*, v.53, p.8-18, 1999.

Wu J, Benjamin RE, Carrell DT. *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biol Reprod*, v.64, 375-381, 2001.

Wu J, Tian Q. Role of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor in the development of porcine preantral follicle *in vitro*. *Zygote*, v.15, p.233-240, 2007.

Yuan YQ, Van Soom A, Coopman FOJ, Mintiens K. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology*, v.59, p.1585-1596, 2003.

Zeiss CJ. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol*, v.40, p.481-495, 2003.
