

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR**

PRISCILA DI PAULA BESSA SANTANA

**A INFLUÊNCIA DO SISTEMA NITRÉRGICO NO CULTIVO *IN*
VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS**

**BELÉM/PA
2012**

PRISCILA DI PAULA BESSA SANTANA

A INFLUÊNCIA DO SISTEMA NITRÉRGICO NO CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, da Universidade Federal do Pará, como requisito à obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Moysés dos Santos Miranda.

**BELÉM/PA
2012**

PRISCILA DI PAULA BESSA SANTANA

**A INFLUÊNCIA DO SISTEMA NITRÉRGICO NO CULTIVO *IN VITRO*
DE EMBRIÕES BOVINOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, da Universidade Federal do Pará, como requisito à obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Banca Examinadora:

Drº Moysés dos Santos Miranda (**Orientador**)
(Instituto de Ciências Biológicas - UFPA)

Profº Drº Anderson Manoel Herculano da Silva
(Instituto de Ciências Biológicas - UFPA)

Profº Drº André Salim Khayat
(Instituto de Ciências Biológicas - UFPA)

Profº Drº Otávio Mitio Ohashi
(Instituto de Ciências Biológicas - UFPA)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Marlene Bessa e Walter Santana

Ao meus irmãos Wylliam e Alex,

Aos meus Avós, Luiza e Mário Bessa

Aos tios, tias, e primos queridos,

Amigos e amigas queridos, especialmente Mário.

AGRADECIMENTOS

Á Deus que me concede a vida e a esperança de todos os dias.

Aos meus Pais, Walter Santana e Marlene Bessa. Vivo os meus dias para honrá-los através das minhas ações, escolhas e conquistas.

Aos meus Irmãos Alex e Wylliam, tios, tias, primos e primas. Especialmente os meus avós Mário e Luiza Bessa, que são dois vós corujas e orgulhosos dos netos que têm. Mas dessa vez eu que digo: sou orgulhosa por ter vós maravilhosos.

Ao Professor Otávio Mitio Ohashi e Professor Moysés dos Santos Miranda por ensinar, orientar e por serem como são. Ninguém tem dúvida, vocês são um exemplo de caráter, persistência e sucesso, admiráveis em muitos sentidos.

A professora Simone do Socorro Damasceno Santos, afinal a senhora sempre tem algo inusitado para dizer, geralmente o que a maioria das pessoas não teria coragem e faz a gente refletir sobre muita coisa.

A professora Nathália Nogueira da Costa, amiga muito querida, cujas qualidades são tantas que, pra resumir, quem conhece a Nath, sabe que ela é um anjo de Deus. Obrigada, Nath, por estar sempre disposta a ajudar, ouvir e discutir. Por me ensinar a fazer extrações, placas, PCRs, e etc etc etc

Ao professor Thiago Velasco e a professora Marcela Cordeiro, excelentes exemplos de sucesso. Aos amigos do Lab FIV, o André, o Bruno, a Carla, o Elias, o Leonardo, a Mayra, a Stéfanne, a Veluma.

O técnico Renato que muito colaborou na realização deste trabalho, e de outros tantos mais, com as suas idas e vindas ao abatedouro para trazer ao laboratório os preciosos ovários. Ao matadouro frigorífico SOCIPE pela doação do material.

Ao professor Herculano, obrigada por disponibilizar as drogas inibidoras para este estudo, e pela sua disposição em discutir as questões do Óxido nítrico. Sem dúvida, sua participação foi muito importante para a realização desse trabalho.

A professora Edilene por nos receber em seu laboratório, para a realização das dosagens de nitrito. E seu aluno Bruno, que com muita paciência e solicitude nos ensinou a técnica e nos acompanhou nos experimentos de dosagem.

Ao professor Artur Luiz da Costa da Silva por abrir as portas de seu laboratório, para a realização dos experimentos de PCR tempo real.

Ao professor Luis do laboratório de neuroquímica por disponibilizar o espectrofotômetro para a leitura das dosagens de nitrito.

Ao professor Marcelo Bahia que foi meu co-orientador por um breve período, mas um breve muito produtivo. Obrigada professor, e sua aluna Taty também.

À Universidade Federal do Pará, ao Instituto de Ciências Biológicas, à Pós-Graduação de Neurociências e Biologia Celular, e a todos os professores que ministraram aula por possibilitarem minha formação acadêmica.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Aos Amigos Tarsila, Roberta Monteiro, Raphaela Lisboa, Elcemir Galvão, Adriano Mendonça, João e Jaiana Moraes, Larissinha e Salomão, Nathalia Oliveira, Henrique, Márcio Braga, Tarcísio e Tayana, pelas boas risadas, maravilhosas!

Ao meu namorado, Mário, que veio por último, mas não menos especial. Amigo e parceiro de toda a hora, obrigada pela sua companhia, que me renova quando estou cansada, em conforta quando estou triste, me suporta quando estou fraca e compartilha das minhas alegrias com a mesma intensidade que compartilha das minhas infelicidades. Obrigada por tudo.

Só pra terminar. Eu gosto muito dessa citação, pois para mim significa que cada coisa por mais minúscula que seja tem sua função nesse mundo, ela pode ser minúscula em tamanho, mas quando está junta aos seus, ela deixa de ser pequena para ser algo sensacional!

"Para você estar aqui agora trilhões de átomos de alguma forma se agruparam de uma maneira intrincada e intrigante para criar você. Este é um arranjo tão especializado e particular que nunca tinha sido tentado antes e irá existir somente uma vez. Para os próximos anos essas minúsculas partículas irão se engajar em bilhões de habilidades, cooperando esforços necessários para manter você intacto e levá-lo a viver o supremo, mas geralmente subapreciado estado conhecido como existência." (Bill Brison).

RESUMO

O Óxido Nítrico (NO^-) é uma molécula de sinalização celular que regula o desenvolvimento embrionário pré-implantacional. Nós investigamos o papel do NO^- no cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro*, através do uso de N-Nitro-L-Arginina Metil Ester (L-NAME), um inibidor da produção de NO^- , e L-arginina (ARG), um precursor de NO^- , em diferentes períodos de cultivo (ativação do genoma embrionário e compactação). Foram avaliados seus efeitos sobre as taxas de desenvolvimento, cinética do desenvolvimento, qualidade embrionária, e expressão gênica. Os embriões foram produzidos por maturação e fertilização *in vitro* de oócitos aspirados de ovários provenientes de abatedouro frigorífico. No experimento 1, as taxas de desenvolvimento foram avaliadas em SOFaa na presença de L-NAME em diferentes períodos: do 1º ao 4º dia de cultivo (LN1-4), do 4º ao 8º (LN4-8) e do 1º ao 8º dia de cultivo (LN1-8). A inibição foi prejudicial a partir do 4º dia de cultivo (grupos LN4-8 e LN1-8), ao reduzir as taxas de eclosão ($17,3\% \pm 13,44$ e $13,7\% \pm 14,51$, respectivamente, $p < 0,05$). Entretanto, o efeito mais negativo ocorreu do 1º ao 8º dia (LN1-8) em que a taxa de blastocisto foi significativamente menor comparada ao controle ($29,4\% \pm 3,72$ vs $47,8\% \pm 11,34$, respectivamente, $p < 0,05$). Por isso no experimento 2, a ARG (1, 10 e 50mM) foi adicionada desde o 1º dia de cultivo. As taxas de blastocisto usando 1 e 10mM de ARG foram similares ao controle ($48\% \pm 13,03$ e $34,2\% \pm 3,92$ vs $49,4\% \pm 4,82$, respectivamente, $p > 0,05$), mas 50mM prejudicou a taxa de desenvolvimento embrionário ($10,7\% \pm 7,24$, $p < 0,001$). No experimento 3, ARG a 1mM foi adicionada do 5º ao 8º dia de cultivo. Foram observadas taxas de desenvolvimento similares ao grupo GLN (somente com glutamina). Mas comparada ao controle (sem ambos os aminoácidos), rendeu melhores taxa de eclosão ($54,8\% \pm 6,9$ vs $41,4\% \pm 11,47$, respectivamente, $p < 0,05$) e qualidade embrionária ($84,8\% \pm 2,63$ vs $52\% \pm 8,62$, respectivamente, $p < 0,05$), mas não de taxa de blastocisto ($49,4\% \pm 6,5$ vs $49,4\% \pm 4,8$, respectivamente, $p > 0,05$). Neste período a produção de NO^- foi positivamente correlacionada com a taxa de eclosão ($R^2 = 96,4\%$, $p < 0,001$) e a qualidade embrionária ($R^2 = 75,5\%$, $p < 0,05$). Adicionalmente, embriões foram cultivados na presença de L-NAME e ARG simultaneamente (grupo ARG/LN), do 5º ao 8º dia de cultivo, e os transcritos de OCT-4 e INT-t foram quantificados por PCR tempo real. Foi encontrada expressão similar de OCT-4 ($p > 0,05$), mas redução de 1,8x e 1,5x de INT-t em relação aos grupos controles ARG e GLUT ($p < 0,05$), respectivamente. Esses dados fornecem evidências da contribuição do NO^- , principalmente no período entre os estágios de mórula e blastocisto, para a melhoria da eclosão e qualidade embrionária. A produção de NO^- é requerida para o desenvolvimento pré-implantacional de embriões bovinos produzidos *in vitro*, e pode ser mediada pela suplementação do meio de cultivo com ARG.

ABSTRACT

Nitric Oxide (NO⁻) is a cell signaling molecule regulating preimplantation embryo development. We have now investigated the role of NO⁻ in culture of bovine embryos *in vitro* produced, using N-Nitro-L-Arginine Methyl-Ester (L-NAME), an inhibitor of NO⁻ production, and L-arginine (ARG), a precursor for NO⁻, in different periods of culture (embryo genome activation and compaction). NO⁻ effects were assessed by developmental rates, kinetics of development, embryo quality, and gene expression. Embryos were generated by *in vitro* maturation and fertilization of oocytes aspirated from abattoir-derived ovaries. In experiment 1, the rates of development were measured in SOFaa in the presence of L-NAME (10mM) in different periods: from day 1st to 4th (LN1-4), from 4th to 8th (LN4-8) and from day 1st to 8th (LN1-8). The NO⁻ inhibition was detrimental from the day 4th of culture (LN4-8 and LN1-8 groups), decreasing the blastocyst hatching (17.3%±13.44 and 13.7%±14.51, respectively, p<0.05). However the most negative effect occurred from the 1st to 8th day of culture which the blastocyst rate was significantly decreased compared to control (29.4%±3.72 vs 47.8%±11.34, respectively, p<0.05). Due to, in experiment 2, ARG (1, 10 and 50mM) was added since the 1st day of culture. The blastocyst rates using ARG at 1 and 10mM were similar to control (48%±13.03 e 34.2%±3.92 vs 49.4%±4.82, respectively, p>0.05), but 50mM was found to impair embryo development (10.7%±7.24, p<0.001). In experiment 3, ARG at 1mM was added from the 5th to 8th day of culture. The development rates were similar to GLN group (with glutamine only). However, compared to control group (without both aminoacids) ARG addition yielded improved blastocyst hatching (54.8%±6.9 vs 41.4%±11.47, respectively, p<0.05) and embryo quality (84.8%±2.63 vs 52%±8.62, respectively, p<0.05), but not blastocyst rate (49.4%±6.5 vs 49.4%±4.8, respectively, p>0.05). NO⁻ production was positively correlated with blastocyst hatching (R²=96.4%, p<0.001) and embryo quality (R²=75.5%, p<0.05). Additionally, embryos were cultured in the presence of L-NAME and ARG simultaneously (ARG/LN group), from the 5th to 8th day of culture, and OCT-4 and INT-t transcripts were measured by real time PCR. Was found a similar expression of OCT-4 (p>0.05), but a significant decrease of 1.8 and 1.5 fold of INT-t expression related to control groups ARG and Glutamine (p<0.05), respectively. These data provide evidence that NO⁻ contributes to hatching and embryo quality improvement, especially at the period between morula and blastocyst stages. NO⁻ production is required to preimplantational development of bovine embryos *in vitro* produced and can be mediated by supplementation of medium culture with ARG.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Produção total de embriões bovinos no Brasil de acordo com a biotécnica empregada, desde 1995 até 2009	15
Figura 2: Principais enzimas do ciclo Arginina/Citrulina, ou ciclo Citrulina/NO ⁻	22
Figura 3: Reação de oxi-redução catalizada pelas Óxido Nítrico Sintase para a conversão de Arginina em L-Citrulina e NO ⁻	23
Figura 4: Esquema ilustrando as fases de desenvolvimento do embrião bovino	27
Figura 5: Esquema do experimento 1 mostrando os períodos de adição de L-NAME no cultivo <i>in vitro</i> : de D1 até D4 (LN1-4), de D4 até D8 (LN4-8), e ao longo de todo o período de cultivo, D1 a D8 (LN1-8)	37
Figura 6: Esquema do experimento 2 mostrando o grupo controle sem L-glutamina (Gln) nem Arginina (Arg), e os grupos experimentais contendo Gln (2mM) e Arg em diferentes concentrações	38
Figura 7: Esquema do experimento 3 mostrando o período de adição de arginina (Arg) no 5º dia de cultivo <i>in vitro</i> (D5, indicado pela seta) até o 8º dia	39
Figura 8: Fotografias mostrando as etapas de aspiração folicular (A), a seleção (B) do Complexo <i>Cumulus-Oócito</i> (C) feita sob estereomicroscópio e a maturação <i>in vitro</i> em estufa úmida com 38,5°C e 5% de CO ₂ (D)	41
Figura 9: Fotografia mostrando o sêmen sobre gradiente descontínuo (45 e 90%, respectivamente) de Percoll, antes da centrifugação	42
Figura 10: Fotografias mostrando as placa de cultivo (A), e blastocistos eclodidos no 8º dia de desenvolvimento (B)	44
Figura 11: Fotomicrografias mostrando a morfologia embrionária, no 8º dia de cultivo, dos quatro grupos analisados no experimento 1	50

Figura 12: Fotomicrografias mostrando a morfologia embrionária, no 8º dia de cultivo, dos cinco grupos analisados no experimento 2	56
Figura 13: Fotomicrografias mostrando a morfologia embrionária, no 8º dia de cultivo, dos três grupos analisados no experimento 3	60
Figura 14: Curva de Regressão mostrando a relação diretamente proporcional entre a taxa de eclosão de embriões bovinos tratados do 5º ao 8º dia de cultivo, e a concentração de Nitrito/Nitrato produzida por embrião (uM)	63
Figura 15: Curva de Regressão mostrando a relação diretamente proporcional entre a concentração de Nitrito/Nitrato produzidos por embrião (uM) e a taxa de embriões qualidade Grau 1 de embriões bovinos tratados do 5º ao 8º dia de cultivo	64
Figura 16: Expressão relativa dos transcritos do gene Oct-4 em embriões cultivados <i>in vitro</i> em meio contendo aminoácidos somente a partir do 5º dia de desenvolvimento	65
Figura 17: Expressão relativa dos transcritos do gene Interferon-t em embriões cultivados <i>in vitro</i> em meio contendo aminoácidos somente a partir do 5º dia de Desenvolvimento	66
Figura 18: Esquema hipotético da inibição dos mecanismos ativados pela ARG/NO- nas células trofoblásticas de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i>	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: O número de acesso dos genes IFN τ , OCT-4 e H2A	47
Tabela 2: Taxas de Clivagem e Blastocisto do experimento 1	49
Tabela 3: Taxas de Cinética do desenvolvimento no 8 ^o dia de cultivo embrionário	51
Tabela 4: Análise da morfologia embrionária analisada no 8 ^o dia de cultivo	52
Tabela 5: Concentração de Nitrato/Nitrito medidos em meio do 8 ^o dia de cultivo. Concentração total e dividida pelo número de embriões produzidos no experimento 1....	53
Tabela 6: Taxas de Clivagem em D1 (0 hora), D2 (24 horas) e D4 (72 horas) de cultivo em meio contendo diferentes concentrações de Arginina	54
Tabela 7: Taxas de Blastocisto do experimento 2	55
Tabela 8: Taxas de Cinética do desenvolvimento no 8 ^o dia de cultivo embrionário	57
Tabela 9: Avaliação morfológica dos embriões no 8 ^o dia de desenvolvimento	58
Tabela 10: Taxas de Blastocisto do experimento 3	59
Tabela 11: Taxas de Cinética do desenvolvimento no 8 ^o dia de cultivo	61
Tabela 12: Avaliação morfológica no 8 ^o dia de desenvolvimento embrionário	61
Tabela 13: Concentração de Nitrato/Nitrito total medida em gotas de cultivo. Dividida pelo número de embriões produzidos em cada grupo, e medida em gotas do co-cultivo de células da granulosa	62

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ARG	Arginina
ASL	Argininosuccinato liase
ASS	L-Argininosuccinato Sintase
ATP	Adenosina Tri-fosfato
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAT	Canais Transportadores de Aminoácidos Catiônicos
CCOs	Complexos <i>cumulus-oócitos</i>
cDNA	Ácido Desoxiribonucléico complementar
CO ₂	Dióxido de Carbono
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
EROS	Espécies Reativas do Oxigênio
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FMN	Flavina Mononucleotídeo
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GLN	L-Glutamina
GMP _c	Guanosina 3'5'-Monofosfato cíclico
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IETS	Sociedade Internacional de Transferência de Embriões
IGF-1	Fator de ligado a insulina-1
LH	Hormônio Luteinizante
L-NAME	N-Nitro-L-Arginine Metil Ester
L-NOARG	NG-nitro-L-arginina

MIV	Maturação <i>in vitro</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfatada
NMMA	NG-Monomethyl-L-Arginina
NO ⁻	Óxido Nítrico
NONOate	2,2-Hidroxinitrosohidrazino Bisethanamina
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NOS-1	Óxido Nítrico Sintase tipo I
NOS-2	Óxido Nítrico Sintase tipo II
NOS-3	Óxido Nítrico Sintase tipo III
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
ONOO-	Peroxinitrito
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Superóxido
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIVE	Produção <i>In Vitro</i> de Embrões
PVA	Alcool Polivinílico
RNA	Ácido Ribonucléico
Rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
SNP	Nitroprussiato de Sódio
SOCIPE	Sociedade Cooperativista dos Pecuaristas
SOF	Synthetic Oviduct Fluid
TALP	Tyrodes com Albumina, Lactato e Piruvato
TCM-199	Tissue Culture Medium - 199

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	IMPORTÂNCIA DO NO ⁻ NOS PROCESSOS REPRODUTIVOS	18
2.2	OS AMINOÁCIDOS E A PRODUÇÃO DE NO ⁻ NA CÉLULA	20
2.3	CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	26
2.3.1	Descrição dos genes avaliados neste estudo	28
2.3.1.1	Gene Octamer-binding transcription factor-4 (OCT 4) ou POU5F1	28
2.3.1.2	Gene Interferon-tau (INT- τ)	29
2.4	A QUALIDADE EMBRIONÁRIA	29
2.5	O ÓXIDO NÍTRICO E O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	32
2.6	HIPÓTESE	34
2.7	OBJETIVOS	35
2.7.1	Objetivo Geral	35
2.7.2	Objetivos Específicos	35
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	36
3.1.1	Experimento 1: Uso de L-NAME antes e após o 4 ^o dia de cultivo	37
3.1.2	Experimento 2: Curva dose-resposta de L-Arginina	38
3.1.3	Experimento 3: Suplementação após o 5 ^o dia de cultivo	39
3.2	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	40
3.2.1	Aspiração folicular, Seleção oocitária e Maturação <i>In vitro</i>	40
3.2.2	Fecundação <i>In Vitro</i>	42
3.2.3	Cultivo <i>In Vitro</i>	43
3.2.4	Avaliação da morfologia embrionária	44
3.3	MEDIÇÃO DE METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO	45
3.4	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EMBRIONÁRIA	46

3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
4	RESULTADOS	49
4.1	EXPERIMENTO 1: USO DE L-NAME ANTES E APÓS O 4º DIA DE CULTIVO	49
4.2	EXPERIMENTO 2: CURVA DOSE RESPOSTA DE ARGININA	54
4.3	EXPERIMENTO 3: NO ⁻ E O PERÍODO DO 5º AO 8º DIA DE CULTIVO	59
4.4	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	64
5.	DISCUSSÃO	67
5.1	O EFEITO DOSE DEPENDENTE DO SISTEMA ARGININA/NO ⁻ SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i>	67
5.2	O EFEITO ESTÁGIO DEPENDENTE DO SISTEMA ARGININA/NO ⁻ SOBRE O DESENVOLVIMENTO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS: SEU PAPEL NO PROCESSO DE ECLOSÃO DO BLASTOCISTO	71
5.3	A REGULAÇÃO DOSE E TEMPO DEPENDENTE DO SISTEMA ARGININA/NO ⁻ CONTRIBUEM PARA A MELHORIA DA QUALIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i> : SUA IMPLICAÇÃO NO PROCESSO DE IMPLANTAÇÃO EM BOVINOS	74
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

1 INTRODUÇÃO

A Produção *In Vitro* de Embriões (PIVE) é uma das biotécnicas reprodutivas mais usadas na espécie bovina. Dados divulgados pelo *Data Retrieval Committee*, da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), registraram o valor total de 289.952 embriões produzidos no Brasil, em 2008. Desse total, 69.527 embriões foram produzidos *in vivo* e 220.425 produzidos *in vitro* (Figura 1), sendo que este último correspondeu a 66,6% do total de embriões produzidos *in vitro* no mundo. Esses dados destacaram o Brasil como líder mundial no uso da PIVE e revelaram a tendência crescente de seu uso no país (Viana et al., 2010).

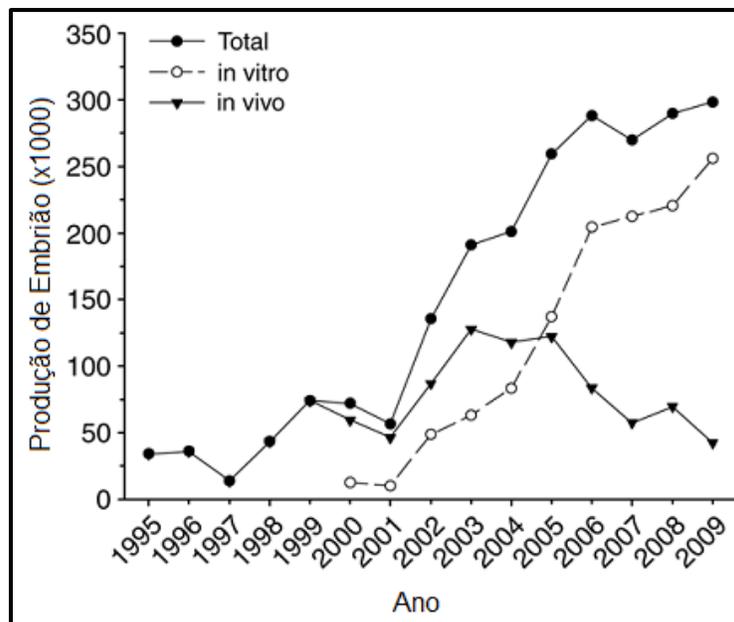


Figura 1: Produção total de embriões bovinos no Brasil de acordo com a biotécnica empregada, desde 1995 até 2009. Embriões *in vivo* foram produzidos por superovulação e transferência de embrião (convencional). Embriões *in vitro* foram produzidos em laboratório por Produção *In vitro* de Embriões. Modificada de Viana et al. (2010).

A PIVE envolve as etapas de colheita de oócitos, maturação (MIV), fecundação (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) até o estágio de blastocisto. Dada a complexidade dos diferentes ambientes através dos quais os gametas e embriões passam durante o desenvolvimento *in vivo*, um dos grandes desafios da PIVE é simular *in vitro* esses ambientes.

De modo a ter máxima eficiência em cada etapa da PIVE e como resultado final a produção de embriões de qualidade em grande quantidade (Meirelles et al., 2004), as condições da PIVE vêm sendo constantemente aperfeiçoadas (Varago et al., 2008), proporcionando atualmente, em média, taxa de blastocisto de 41,4% na raça Nelore. No entanto, a taxa de prenhez obtida com a transferência de embriões produzidos *in vitro*, ainda é menor comparada a de embriões produzidos *in vivo* (33,4% vs 45%, respectivamente) (Pontes et al., 2009).

Além disso, a qualidade do embrião *in vitro* é considerada inferior a do produzido *in vivo* (Rizos et al., 2002) pois, frequentemente, apresentam características consideradas má preditoras do desenvolvimento. Por exemplo, a cavitação precoce sem compactação adequada, proteínas de comunicação intercelular reduzidas, ciclos celulares atrasados resultando em retardo do desenvolvimento e menor número de células (Lonergan et al., 2003).

A ocorrência dessas características tem sido atribuída à composição do meio que inclui a presença em concentrações inadequadas de íons, tampões, aminoácidos, substratos energéticos, fatores de crescimento, antioxidantes (Lonergan et al., 2006) e também as condições do ambiente de cultivo *in vitro*, como a composição atmosférica (Harvey et al., 2004). Desta forma, muitos

pesquisadores tem sugerido a suplementação dos meios de cultivo com o objetivo de melhorar a qualidade do embrião produzido *in vitro*.

Um exemplo é a suplementação dos meios de cultivo com mistura de aminoácidos essenciais e não essenciais, visto que os aminoácidos exercem inúmeras funções como: matéria-prima para síntese de proteínas e nucleotídeos, fonte de energia, antioxidantes, reguladores de pH, osmólitos, quelantes e precursores de moléculas como o NO⁻ e glutamato (Van Winkle, 2001).

A adição de arginina, aminoácido precursor de Óxido Nítrico (NO⁻), ao meio de fecundação *in vitro* tem sido sugerido para a indução da capacitação espermática e reação acrossômica em espermatozoides bovinos (O'Flaherty et al., 2004). Outros estudos têm relatado as ações do NO⁻ na promoção da maturação oocitária em bovinos (Schwarz et al., 2010), suínos (Tao et al., 2005) e camundongos (Sengoku et al., 2001). E também na regulação da implantação embrionária em camundongos (Barroso et al., 1998; Gouge et al., 1998).

Quanto aos efeitos do NO⁻ durante o cultivo *in vitro* de embriões os relatos são diversos. Barroso *et al.* (1998) relataram prejuízo ao desenvolvimento pré-implantacional de camundongos na presença de concentrações elevadas de doador sintético de NO⁻. Enquanto outros autores têm relatado que níveis moderados de NO⁻ são necessários ao desenvolvimento adequado do embrião (Kim et al., 2004; Manser et al., 2004). Considerando os relatos na literatura, esse trabalho tem o objetivo de avaliar o desenvolvimento e qualidade de embriões bovinos cultivados em meio suplementado com aminoácido precursor de NO⁻.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DO NO[•] NOS PROCESSOS REPRODUTIVOS

O NO[•] é um gás incolor, inodoro e biologicamente ativo, cuja importância tem sido relatada em diversos processos fisiológicos (Moncada et al., 1991). No princípio, era reconhecido apenas como “o fator de relaxamento do epitélio”, pois ao ser induzido pela acetilcolina causava o relaxamento de vasos sanguíneos. Até que em 1987, sua identidade foi revelada como sendo o NO[•] (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987).

Desde então várias funções do NO[•] foram sendo descritas. Em neurônios do córtex central, o NO[•] é produzido em resposta ao glutamato, e age como um importante neuromodulador (Garthwaite et al., 1988). Macrófagos ativados produzem grande quantidade de NO[•] que tem efeito citotóxico sobre agentes invasores, auxiliando a resposta imune no organismo (Hibbs et al., 1988). Também é produzido por células do músculo liso, onde induz a formação de Guanosina 3'5'-Monofosfato (GMPc) e aumento de cálcio intracelular, promovendo o efeito de relaxamento muscular (Munzel et al., 2003). Tem função relatada no processo de angiogênese, pois estimula a sobrevivência celular, proliferação e migração das células endoteliais (Cooke, 2003), e também em processos reprodutivos como a ovulação e a maturação dos gametas feminino e masculino.

O processo de ovulação é um evento inflamatório controlado, promovido por citocinas, prostaglandinas e $TNF\alpha$, em que ocorre primeiro a degeneração da parede do folículo e superfície ovariana para que haja a liberação do oócito (Amsterdam and Sasson, 2002). Foi relatado que a inibição da produção de NO^- , diminuiu a produção de prostaglandinas em resposta a Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG), indicando que o NO^- é um indutor importante da resposta inflamatória durante a ovulação (Faletti et al., 1999). Outra evidência interessante, é que fêmeas “knockout” para a isoforma tipo III ou endotelial de Óxido Nítrico Sintase (NOS-3) mostraram uma redução significativa de 63% na taxa de ovulação comparado às fêmeas selvagem (Jablonka-Shariff and Olson, 1998).

O NO^- também atua sobre a maturação *in vitro* dos gametas feminino e masculino. Schwarz et al. (2000) relataram que a inibição da produção de NO^- reduziu a progressão para metáfase II, ao inibir a extrusão do primeiro corpúsculo polar em oócitos bovinos. No espermatozoide, a inibição de NO^- diminuiu a taxa de reação acrossômica, um evento exocítico essencial para que o espermatozoide efetue a penetração no oócito. Sugerindo que o NO^- tenha um papel importante durante a fecundação (O'Flaherty et al., 2004).

A maturação oocitária, fecundação e desenvolvimento embrionário inicial são eventos reprodutivos importantes que ocorrem ao longo da tuba uterina, um ambiente altamente dinâmico e fisiologicamente regulado ao longo do ciclo estral. A tuba uterina é dividida em diferentes porções (infundíbulo, ampola e istmo) e seu interior é preenchido por um fluido cuja composição vai mudando à medida que se aproxima do útero (Gardner et al., 1996).

Foi relatada a expressão diferencial das isoformas de Óxido Nítrico Sintase (NOS) entre os segmentos da tuba uterina. A NOS-3 aumentou na fase final do ciclo estral sendo associada a vasodilatação dos vasos sanguíneos vizinhos ao epitélio do oviduto, extravasamento do plasma sanguíneo e consequente formação de fluido luminal. A isoforma tipo I (NOS-1), ou neuronal, aumentou na fase pós-ovulatória na região do Istmo sendo associada ao relaxamento do músculo liso nessa região para permitir a passagem do embrião para o útero. Já a tipo II (NOS-2), ou induzida, aumentou na fase periovulatória na região da ampola sendo associada a promoção da maturação oocitária e da atividade ciliar do epitélio do oviduto (Lapointe et al., 2006; Yilmaz et al., 2011). Essas evidências sugerem que o NO^- desempenha funções sobre a maturação dos gametas, fecundação e mesmo sobre o desenvolvimento embrionário pré-implantacional.

2.2 OS AMINOÁCIDOS E A PRODUÇÃO DE NO^- NA CÉLULA

Os aminoácidos são essenciais ao metabolismo celular. Na degradação da maioria dos aminoácidos, inicialmente é retirado o grupo α -amina e o esqueleto de carbono é aproveitado por outras rotas. Como na formação de metabólitos intermediários (2-oxiglutarato, fumarato, succinil-CoA, oxalacetato e piruvato) no ciclo do citrato. Esses metabólitos podem ser transformados em glicose, porfirina, e ácidos graxos, que são fornecidos para outras rotas anabólicas como, por

exemplo, a gliconeogênese. Ou, por reação anaplerótica, podem ser regeneradas em aminoácidos reabastecendo o ciclo do citrato (Koolman and Rohm, 2005a).

A arginina e a glutamina são aminoácidos glicogênicos, ou seja, formam o metabólito intermediário 2-oxiglutarato que pode ser transformado em glicose no fígado e nos rins. Também participam da excreção de bases nitrogenadas, no ciclo da uréia, arginina e glutamina são aminoácidos semi-essencial e essencial, respectivamente. Essencial porque é obtido por meio da ingestão de alimentos ricos em proteína animal como carne e laticínios. E semi-essencial porque, além de ser obtido da dieta, também é produzido no organismo, mas em quantidades insuficientes para suprir a sua demanda (Koolman and Rohm, 2005b).

No intestino delgado a arginina absorvida da dieta é transformada em citrulina, assim como a glutamina e a prolina, as quais por desaminação são transformadas em glutamato e depois em citrulina também. Uma vez na corrente sanguínea a citrulina chega ao fígado e rins, os principais órgãos que regulam o metabolismo da arginina (Wu and Morris, 1998). A arginina pode ser usada para a síntese de proteínas, de creatina (metabolismo das células musculares), de ornitina (aminoácido raro precursor de poliaminas), e para síntese de citrulina gerando também o NO^- (Flora-Filho and Zilberstein, 2000).

Em macrófagos, a arginina intracelular disponível é convertida para L-citrulina e NO^- , pelas enzimas NOS. É feita, também, a reciclagem da arginina a partir da citrulina pela ação combinada das enzimas L-Argininosuccinato Sintase (ASS) e Argininosuccinato liase (ASL), como mostra a Figura 2. Mantendo sempre ativa a produção de NO^- pelo macrófago (Wu and Brosnan, 1992). Essas reações são dependentes da disponibilidade de Arginina, L-citrulina e NO^- no interior das

células e podem ser reguladas pela atividade enzimática da célula, pela disponibilidade de cofatores e pelo transporte de aminoácidos, que é feito através de proteínas transportadoras de aminoácidos catiônicos (CAT), no caso da arginina (Van Winkle and Campione, 1990).

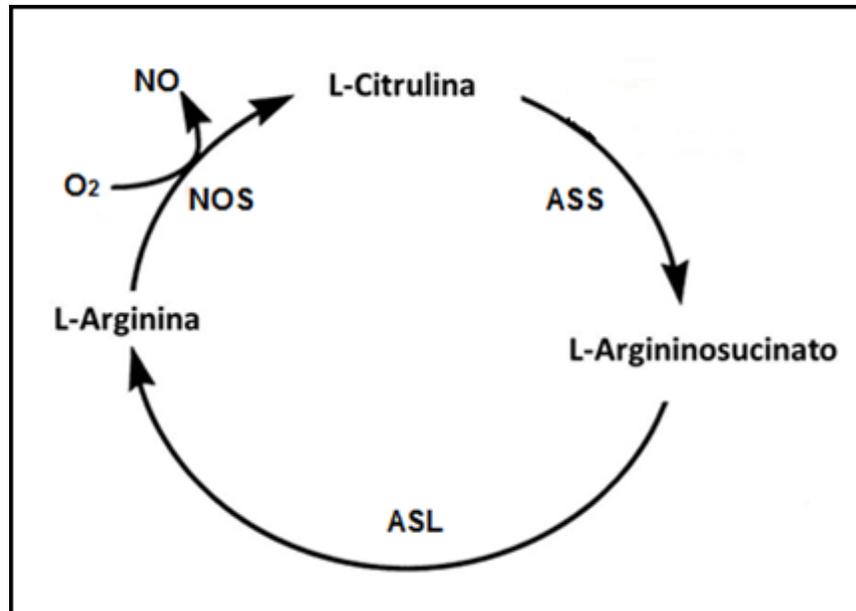


Figura 2: Principais enzimas do ciclo Arginina/Citrulina, ou ciclo Citrulina/NO⁻. As Óxido Nítrico Sintase (NOS) sintetizam L-citrulina e NO⁻ a partir de Arginina, e as enzimas L-Argininosuccinato Sintase (ASS) e Argininosuccinato liase (ASL) catalisam a reação inversa. Fonte: adaptado de Wu e Morris, 1998.

As NOS são enzimas centrais para a produção de NO⁻, pois catalisam uma reação de oxirredução da arginina em citrulina, com formação de NO⁻ como subproduto, como mostra a Figura 3. Para isso tem a participação de vários cofatores, como flavinas, tetrahydrobiopterina (BH₄), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada (NADPH), e calmodulina ligada ao cálcio (Stuehr, 2004).

(H₂O₂) formando Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) como o peroxinitrito (ONOO⁻). Devido à sua meia vida, somente os metabólitos NO₃⁻ e NO₂⁻ ou o ONOO⁻, podem ser eventualmente medidos para a avaliação indireta da produção de NO⁻ (Ricart-Jane et al., 2002).

O NO⁻ é uma molécula gasosa que desempenha diversas funções de acordo com o tipo celular. Pode originar o ONOO⁻ que é um potente agente oxidante, e citotóxico para muitos tipos celulares, pois pode causar muitos danos a célula como a diminuição do potencial redutor do citoplasma, oxidação dos grupos sulfidril das proteínas, peroxidação lipídica, quebra da dupla fita de DNA, e disfunções da mitocôndria (Virag et al., 2003). Mas em macrófagos, a produção de ONOO⁻ é essencial para a função de defesa, pois age causando danos oxidativos a parasitas intracelulares como o *Trypanosoma cruzi* (Alvarez et al., 2011).

O NO⁻ pode atuar como um radical livre, por outro lado também atua como uma molécula de sinalização tanto autócrina quanto parácrina, pois pode difundir pela membrana plasmática devido ao seu baixo peso molecular e a sua natureza lipofílica, sendo que não há receptores de membrana específicos mediando sua ação (Bruckdorfer, 2005). No citosol, o NO⁻ se liga a Guanilato Ciclase resultando na geração de GMPc, o qual inicia uma cascata de fosforilações no citoplasma da célula e só termina quando a fosfodiesterase inativa o GMPc (Murad, 1999). Essas funções são bem relatadas no modelo de sinalização para a contração do músculo liso e inibição da ativação plaquetária induzida pelo NO⁻ (Bruckdorfer, 2005).

O NO⁻ também é capaz de interagir com muitas proteínas, ao formar ligação covalente estável com o grupo tiol reativas de um resíduo de cisteína da proteína. Esse mecanismo, chamado S-nitrosilação tem sido relatado como uma

modificação pós-traducional capaz de modular a atividade de proteínas oxidase e redutase, modificando o potencial redox da célula. Modular a atividade de histonas desacetilases, influenciando o perfil de expressão gênica da célula. E modular a atividade de proteínas cinases (por exemplo, Akt e MAPK kinase) e GTPases monoméricas (RAS), influenciando a atividade de vias de transdução de sinal (Hess and Stamler, 2012; Wang, 2012).

Diante da diversidade de mecanismos celulares que o NO^- pode ativar, os pesquisadores tem usado uma série de substâncias para investigar as suas funções em diferentes tipos celulares. São usados doadores de NO^- , como o Nitroprussiato de Sódio (SNP) e o 2,2-Hidroxinitrosohidrazino Bisethanamina, (NONOate) (Scatena et al., 2005). Sequestradores de NO^- como a hemoglobina (Lim and Hansel, 1998). E também inibidores de NO^- , que são geralmente análogos da Arginina que agem como inibidores competitivos pouco seletivos para as isoformas de NOS (Boucher et al., 1999). Os mais conhecidos são o NG-Monomethyl-L-Arginina (NMMA), NG-Nitro-L-Arginina (L-NOARG) e N-Nitro-L-Arginine Metil Ester (L-NAME), sendo este último o mais utilizado devido a sua alta solubilidade em água (Rees et al., 1990).

2.3 O CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

O CIV é uma das etapas mais críticas do processo de PIVE e tem como objetivo garantir as condições adequadas para o desenvolvimento dos zigotos até o estágio de blastocisto (Figura 4). Essas condições são diversas e não são totalmente conhecidas, visto que a composição do ambiente intra-uterino, sob regulação fisiológica, pode ser alterada rápida e continuamente para prover as substâncias necessárias aos diferentes estágios de desenvolvimento embrionário (Knobil and Neill, 2006). A natureza dinâmica do ambiente de cultivo *in vivo* e do desenvolvimento embrionário fazem do cultivo *in vitro* de embriões uma tarefa complexa, exibindo grande variação em termos de qualidade desenvolvimento embrionário (Varago et al., 2008).

Durante o cultivo os embriões passam por vários eventos morfogenéticos como a ativação do genoma embrionário, compactação da mórula, formação dos blastocistos e eclosão (Badr et al., 2007). A ativação do genoma embrionário ocorre por volta do 4º ciclo celular na espécie bovina, no estágio de 8 a 16 células, antes desse período o embrião tem atividade transcricional quiescente e as funções celulares são suportadas pelo mRNA materno, armazenado pelo oócito durante o processo de crescimento (Vigneault et al., 2009). O período de ativação corresponde justamente ao estágio em que a maior parte dos embriões cultivados *in vitro* sofre o bloqueio do desenvolvimento, sendo sugerido que tanto fatores intrínsecos relacionados a qualidade oocitária, quanto condições de cultivo inadequadas estariam envolvidas na origem do bloqueio (Meirelles et al., 2004).

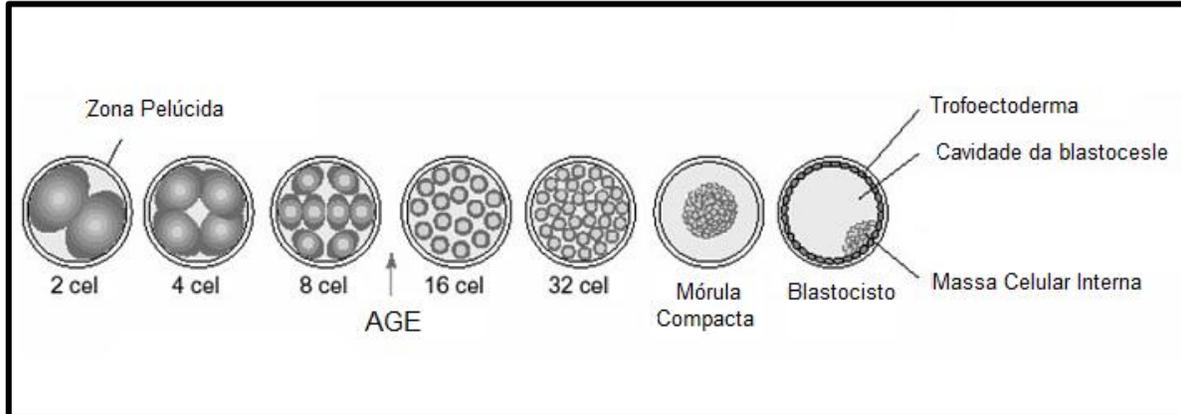


Figura 4: Esquema ilustrando as fases de desenvolvimento do embrião bovino. Após a fecundação o zigoto formado realiza sucessivas divisões celulares, e no estágio entre 8 e 16 células, aproximadamente no 4º dia de desenvolvimento, ocorre a ativação do genoma embrionário (AGE). No quinto dia, ocorre a formação de uma massa de células fortemente compactada, denominada mórula compacta. No sétimo dia de desenvolvimento ocorre a formação da cavidade da blastocestele, e primeira diferenciação celular que origina o trofoectoderma e a massa celular interna. Fonte: adaptada de Badr et al. (2007).

Cada estágio do desenvolvimento requer a regulação de famílias de genes, conferindo um perfil de expressão importante para a obtenção de embriões de boa qualidade (Watson et al., 2004). No estágio de mórula, por exemplo, a expressão de moléculas de comunicação intercelular é necessária para a compactação (Boni et al., 1999). Assim como no estágio de blastocisto é necessária a mudança do perfil de expressão que torna diferenciadas as células do trofoblasto e embrioblasto, que originarão os anexos embrionários e os tecidos fetais, respectivamente (Degrelle et al., 2005). Por isso, a expressão gênica tem sido considerada um parâmetro para avaliar a competência de desenvolvimento e qualidade embrionária dos embriões produzidos *in vitro*, pois tem sido mostrado que as condições de cultivo têm grande influência sobre os padrões de expressão, e também sobre a qualidade embrionária (Corcoran et al., 2007).

2.3.1 Descrição dos genes avaliados neste estudo

2.3.1.1 Gene Octamer-binding transcription factor-4 (OCT 4) ou POU5F1

O OCT-4 (POU5F1) é um membro da família de fatores de transcrição POU. É considerado um dos principais genes de manutenção e reestabelecimento da pluripotência celular, sendo altamente expresso em células pluripotentes e é gradualmente silenciado quando ocorre diferenciação. É capaz de controlar a expressão de vários genes alvo como o Fgf4, Utf1, osteopontina, Rex1, Hand1 α e β e gonadotrofina coriônica humana (hCG), através da ligação ao DNA na seqüência de octâmero ATGCAAAT (Shi and Jin, 2010).

O OCT-4 é expresso em conjunto com outros genes como o Sox2, Nanog, Sall4, Klf5, Zfp143, Zfp206, Esrrb, Dax1 e Tcfcp2l1 os quais constituem uma circuitaria capaz de regular um padrão de expressão típico de células pluripotentes (Van den Berg et al., 2010). Também é capaz de reprimir a expressão de genes como o Cdx-2, um fator de transcrição essencial para a diferenciação das células da Massa Celular Interna (MCI) em células da linhagem trofoblástica durante o desenvolvimento de embriões pré-implantação (Niwa et al., 2005).

2.3.1.2 Gene Interferon-tau (INT-t)

O Interferon tau (INT-t) é uma citocina secretada pelo blastocisto e um bem relatado sinal de reconhecimento da gravidez em ruminantes e sua principal função *in vivo* envolve o reconhecimento materno/fetal, e a prevenção da liberação de pulsos luteolíticos de prostaglandina F-2 α , que de outra forma levaria à destruição do corpo lúteo, diminuição da secreção de progesterona, logo a interrupção da gravidez (Bazer et al., 2009).

Tem sido relatado que sua expressão em embriões bovinos *in vivo* é detectável nas células do trofoblasto somente no estágio de blastocisto quando ocorre a primeira diferenciação celular (Degrelle et al., 2005). No entanto, tem sido relatado que as condições de cultivo e mesmo o estágio de desenvolvimento podem alterar sua expressão, estando assim relacionado à qualidade embrionária (Kimura et al., 2004; Neira et al., 2007; Yao et al., 2009).

2.4 A QUALIDADE EMBRIONÁRIA

Entende-se por qualidade embrionária, uma série de características relativas a morfologia, expressão gênica, metabolismo e criotolerância (Lonergan et al., 2006). A caracterização morfológica tem sido o método preferencial de avaliação da qualidade, pois não é invasivo, e preserva a integridade do embrião. É baseada em critérios como a velocidade das clivagens, número e regularidade

dos blastômeros, aspecto do citoplasma, cinética de desenvolvimento, diâmetro do embrião (Van Soom et al., 2003), presença de fragmentação citoplasmática (Alikani et al., 1999), e mesmo a morfologia pró-nuclear, usada para inferir a constituição cromossômica em embriões humanos (Gianaroli et al., 2003).

Diferenças marcantes têm sido encontradas entre os embriões produzidos *in vitro* e *in vivo*, em relação a todas as características de qualidade citadas anteriormente. Quanto às morfológicas, embriões *in vitro* geralmente apresentam ciclos celulares atrasados e menor número de células, assim como criotolerância reduzida (Lonergan et al., 2006). Mas com a adição de 10% de SFB ao meio de cultivo, ocorre aumento do número de blastocistos obtidos e melhora da criotolerância a um nível próximo do apresentado por embriões *in vivo* (Rizos et al., 2003). Vários trabalhos têm relatado que a expressão gênica de embriões *in vivo* e *in vitro* é alterada pelo sistema de produção (Badr et al., 2007; Corcoran et al., 2007; Rizos et al., 2008). Considerando estas evidências, tem sido proposto que a qualidade pobre dos embriões *in vitro*, comparada ao *in vivo*, está intimamente associada às condições sub-ótimas de cultivo (Rizos et al., 2008).

Por isso, tem-se buscado imitar as condições de cultivo *in vivo*, que são consideradas ideais. O cultivo em baixa tensão de O₂, mais semelhante a atmosfera *in vivo*, tem mostrado melhores resultados em termos de qualidade embrionária comparado aos sistemas de incubação em atmosfera de alta tensão (Harvey et al., 2007). Enquanto os meios de cultivo mais utilizados são baseados na composição dos fluidos uterinos e do oviduto, como o SOF, Fluido Sintético do Oviduto (Tervit et al., 1972). A adição de uma variedade de suplementos aos meios de cultivo existentes também tem mostrado bons resultados.

Por exemplo, o antioxidante β -mercaptoetanol melhora a qualidade do embrião bovino produzido *in vitro*, ao aumentar a taxa de eclosão, número de células, e síntese de moléculas antioxidantes (Feugang et al., 2004). Enquanto a adição do fator de crescimento ligado a insulina-1 (IGF-1) melhora a taxa de gestação em bovinos, possivelmente por promover a sobrevivência do embrião em condição de estresse (Block, 2007). A adição de misturas de aminoácidos essenciais e não essenciais desde o início do cultivo promove o desenvolvimento embrionário, pois aumenta a taxa de blastocisto, de eclosão e o número de células, no entanto os mecanismos pelos quais esses efeitos ocorrem ainda não estão esclarecidos totalmente (Biggers and Summers, 2008).

Outros pesquisadores propuseram o uso de meios de cultivo sequenciais com composições adequadas aos requerimentos metabólicos dos diferentes estágios de desenvolvimento (Gardner and Lane, 1997). No entanto, esta abordagem tem caído em desuso, diante do fato que é difícil determinar o momento exato em que o embrião poderá requerer determinado nutriente. Por isso, atualmente, a abordagem mais aceita é a de uso de um meio único, contendo os nutrientes necessários para suportar todo o período de cultivo. Nesse caso, o embrião pode, teoricamente, “selecionar” os nutrientes de que necessita em cada estágio do seu desenvolvimento (Biggers and Summers, 2008).

2.5 O ÓXIDO NÍTRICO E O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Estudos envolvendo a função do NO⁻ durante o desenvolvimento do embrião pré-implantacional, tem sido realizados, principalmente em humanos e no modelo murino. Utilizando abordagens *in vivo*, e *in vitro*. Esses estudos têm mostrado resultados interessantes sobre o papel do NO⁻ nesse período.

Golge et al. (1998), utilizando uma abordagem *in vivo*, demonstraram que embriões de camundongo produziam NO⁻ no período pré-implantacional, e que uma vez no ambiente intra-uterino a presença do estradiol foi capaz de regular esse requerimento, ao estimular a expressão de proteínas NOS. Dada as conhecidas funções do NO⁻ sobre a angiogênese e relaxamento dos vasos sanguíneos, foi proposto que a produção de NO⁻, poderia ser um fator importante para o início da implantação ao aumentar o fluxo sanguíneo e permeabilidade capilar no sítio de implantação (Gouge et al., 1998). Outros estudos *in vitro*, demonstraram que a inibição da produção de NO⁻, prejudicou o desenvolvimento de embriões de camundongo, no entanto, a composição do meio de cultivo, principalmente quanto a presença de aminoácidos, influenciava na sensibilidade dos embriões a inibição (Manser et al., 2004; Manser and Houghton, 2006).

Outros estudos, porém, demonstraram que o excesso de NO⁻ foi tóxico ao cultivo *in vitro* de embriões de camundongo (Chen et al., 2001). Sendo sugerido que altas concentrações de NO⁻, encontradas em processos fisiopatológicos decorrentes de reação inflamatória, como a endometriose (Luo et al., 2011), poderiam estar relacionadas a inibição do desenvolvimento embrionário e

implantação (Barroso et al., 1998). Sendo demonstrada, em seguida, a indução da toxicidade e aumento da produção de EROS nessas condições (Orsi, 2006).

As evidências sugerem que o excesso de NO^- e também a inibição completa de sua produção causam o bloqueio do desenvolvimento embrionário pré-implantacional (Chen et al., 2001; Tranguch et al., 2003; Kim et al., 2004). Sendo sugerida que a presença de NO^- em níveis controlados seria requerida para o desenvolvimento por exercer papel importante no metabolismo celular (Manser and Houghton, 2006). Uma evidência a favor dessa idéia é que a presença, em concentração fisiológica, de aminoácido precursor de NO^- como a glutamina (Roth, 1998) é amplamente empregada em meios de cultivo sem relato de prejuízos às células, muito pelo contrário, sua presença é, sobretudo requerida para o cultivo (Dux et al., 1991; Christie and Butler, 1994). No entanto, o efeito da glutamina no cultivo tem sido associado à formação de glutathiona, uma molécula de ação antioxidante (Amores-Sanchez and Medina, 1999), e não se sabe se poderia estar realizando efeito benéfico também via NO^- .

Foi relatada a expressão de proteínas CAT, responsáveis pelo transporte de arginina para o interior da célula, desde o estágio de 2 células até blastocisto, na espécie murina (Van Winkle and Campione, 1990). E também a expressão das enzimas NOS em todos os estágios de desenvolvimento pré-implantacional em camundongos (Tranguch et al., 2003) e em bovinos (Tsfaye et al., 2006). Em embriões bovinos a expressão das isoformas NOS foi, inclusive, diferencialmente expressa, visto que no estágio de 8 células somente NOS-3 e NOS-2 foram expressas, enquanto que nos estágios de mórula, e de blastocisto ocorreu expressão predominante da isoforma NOS-1 (Tsfaye et al., 2006).

Não se sabe exatamente como o NO⁻ pode regular o desenvolvimento, mas essas evidências sugerem que desempenha diferentes funções dependendo do estágio de desenvolvimento. Coincidentemente, vários estudos em camundongos têm relatado que o excesso de NO⁻ bloqueia o desenvolvimento embrionário justamente no estágio de ativação do genoma embrionário nessa espécie (Gouge et al., 1998; Chen et al., 2001; Kim et al., 2004; Manser et al., 2004). Outro estudo empregando um sequestrador de NO⁻, a hemoglobina, verificou maior conversão do estágio de mórula para blastocisto (Lim and Hansel, 1998). As evidências na literatura sugerem que o NO⁻ tem importante papel no desenvolvimento embrionário, mas esses efeitos tem sido controversos, pois parecem ser dependentes da dose e do estágio de desenvolvimento.

2.6 HIPÓTESE

Hipotetizamos que a produção de NO⁻ seja uma condição indispensável ao desenvolvimento pré-implantacional de embriões bovinos, e que ao suplementar o meio de cultivo com arginina, um aminoácido precursor, seria possível melhorar as taxas de desenvolvimento e qualidade do embrião bovino produzido *in vitro*, desde que as condições específicas de dose e tempo dependência sejam determinadas.

2.7 OBJETIVOS

2.7.1 Objetivo Geral

- Avaliar os efeitos da inibição ou estímulo da produção de ON, através do uso do inibidor L-NAME e do substrato Arginina em diferentes períodos do desenvolvimento pré-implantacional do embrião bovino produzido *in vitro*.

2.7.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos da inibição do sistema nitrérgico pelo L-NAME antes e após o quarto dia de desenvolvimento (ativação do genoma embrionário), através das taxas de desenvolvimento, cinética, qualidade embrionária em termos de morfologia, e produção de metabólitos do óxido nítrico;

- Avaliar os efeitos da suplementação do meio de cultivo com diferentes concentrações de Arginina (curva dose-resposta), através das taxas de desenvolvimento, cinética, e qualidade embrionária em termos de morfologia;

- Avaliar os efeitos da suplementação do meio de cultivo com Arginina a partir do quinto dia de desenvolvimento (compactação do embrião), através das taxas de desenvolvimento, cinética, produção de metabólitos do óxido nítrico, e qualidade embrionária em termos de morfologia e expressão gênica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os produtos químicos foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, EUA), exceto os que foram indicados. A Arginina (A6969) e o L-NAME (N-Nitro-L-Arginine Metil Ester, N5751) foram diluídos de acordo com as recomendações do fabricante, aliquotados e armazenados a -20°C, ao abrigo da luz, até o momento do uso.

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram desenhados 3 experimentos para a investigação do efeito da estimulação e/ou inibição da produção de NO⁻ durante o cultivo *in vitro* de embriões bovinos. Os experimentos consistiram na avaliação das taxas de desenvolvimento, cinética e qualidade embrionária após a suplementação do meio de cultivo: com L-NAME antes e após o 4^o dia de desenvolvimento (Experimento 1); com Arginina em diferentes concentrações (Experimento 2); com Arginina do 5^o ao 8^o dia de cultivo (Experimento 3).

3.1.1 Experimento 1: Uso de L-NAME antes e após o 4º dia de cultivo

No experimento 1 foi avaliado o efeito da inibição da produção de NO^- pelo L-NAME antes e após o 4º dia de cultivo embrionário. A Figura 5 mostra de forma esquemática a adição de L-NAME: do 1º ao 4º dia de cultivo (LN1-4), do 4º ao 8º dia (LN4-8); e do 1º ao 8º dia de cultivo (LN1-8). Também foi usado um grupo controle sem adição de L-NAME em nenhum momento do cultivo (grupo SOF).

Para a realização do esquema experimental acima descrito, foi feita a renovação do meio no 4º dia de cultivo, sendo o meio suplementado ou não com L-NAME a 10mM de acordo com o grupo experimental. Foram avaliadas as taxas de clivagem no 2º dia, e de eclosão, cinética do desenvolvimento e qualidade morfológica no 8º dia de cultivo. Foram medidas as concentrações de metabólitos de NO^- no meio em que os embriões foram cultivados.

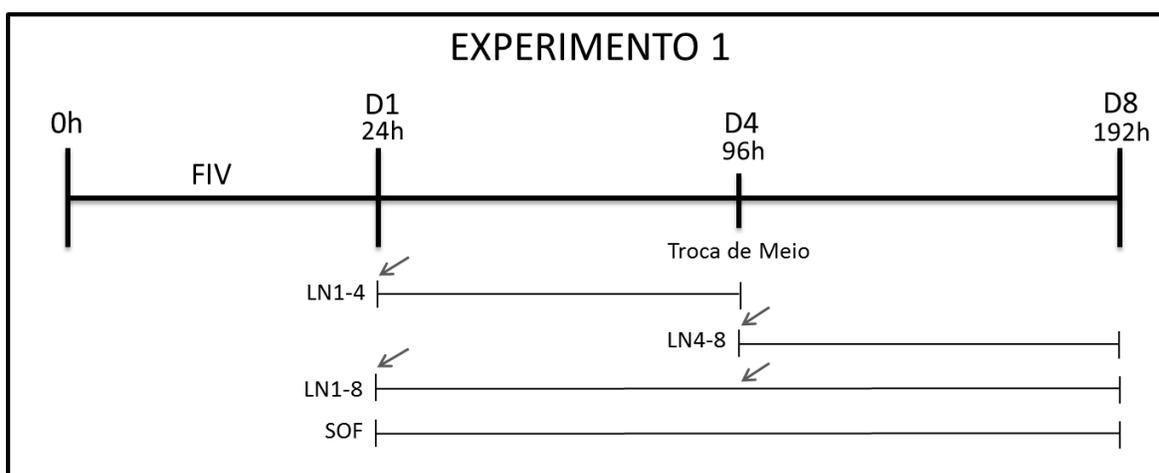


Figura 5: Esquema do experimento 1 mostrando os períodos de adição de L-NAME no cultivo *in vitro*: de D1 até D4 (LN1-4), de D4 até D8 (LN4-8), e ao longo de todo o período de cultivo, D1 a D8 (LN1-8). Foram comparados ao grupo controle (SOF) sem adição de L-NAME (10mM). As setas indicam o momento em que L-NAME foi adicionado ao meio de cultivo (em D1 e/ou D4).

3.1.2 Experimento 2: Curva dose resposta de Arginina

No experimento 2, a Arginina foi adicionada ao período de cultivo em que houve maior prejuízo ao desenvolvimento embrionário em decorrência da inibição por L-NAME (observado no Experimento 1). Foram testadas as concentrações de 1mM, 10mM e 50mM de arginina, as mesmas utilizadas em projeto anterior realizado em nosso laboratório (Silva, 2010).

Os grupos com arginina foram comparados ao grupo contendo glutamina (Gln) a 2mM, e ao grupo controle sem arginina nem glutamina (CT). Foi mantida a renovação do meio no 4º dia de cultivo (usada no experimento 1) para evitar que esta variação experimental interferisse nos resultados.

Ressaltando que a formulação do meio de cultivo empregado (meio SOF) contém quantidade mínima de solução com mistura de aminoácidos essenciais e não essenciais (BME e MEM, respectivamente) de forma que foi avaliado o efeito da adição suplementar de arginina ao meio de cultivo (Figura 6).

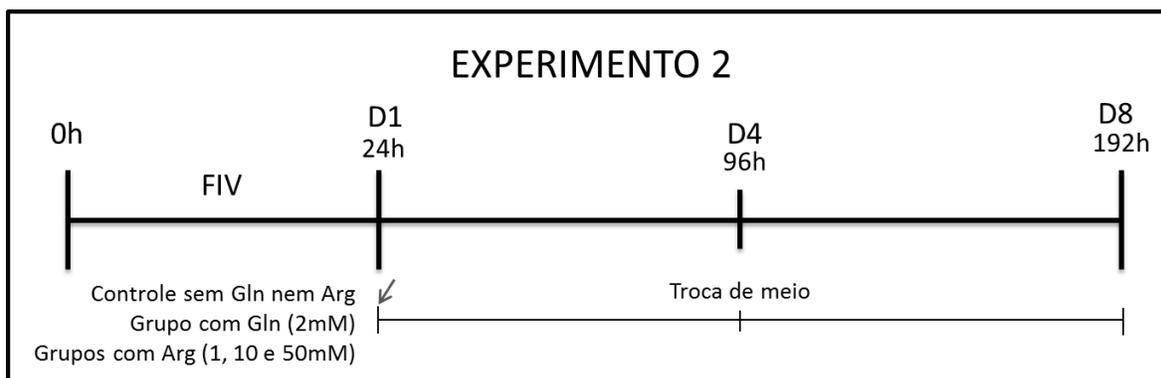


Figura 6: Esquema do experimento 2 mostrando o grupo controle sem L-glutamina (Gln) nem Arginina (Arg), e os grupos experimentais contendo Gln (2mM) e Arg em diferentes concentrações (1, 10 e 50mM) adicionadas desde o 1º dia de cultivo (indicado pela seta) permanecendo até o término do cultivo (D8).

As células da granulosa são frequentemente usadas para o co-cultivo de embriões, pois fornecem nutrientes e fatores de sinalização que estimulam o desenvolvimento embrionário (Parikh et al., 2006). Por isso, esse experimento pode avaliar, isoladamente a produção de NO^- pelo embrião e pelo cultivo de células da granulosa.

3.2 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

3.2.1 Aspiração folicular, Seleção oocitária e Maturação *In vitro*

Ovários bovinos de fêmeas azebuadas foram obtidos no matadouro frigorífico SOCIPE (Sociedade Cooperativista dos Pecuaristas), localizado na estrada do Tapanã-Belém-PA. Os ovários foram lavados em solução salina (NaCl) a 0,9%, acondicionados em frasco com solução estéril de tampão fosfato (PBS), e transportados a temperatura ambiente, para o Laboratório de Fecundação *In vitro* da UFPA em um período máximo de 3 horas.

Folículos antrais medindo entre 2 e 8 mm de diâmetro foram puncionados utilizando seringas acopladas a agulhas de 40 x 12 mm, para a obtenção de Complexos *Cumulus-Oócitos* (CCOs). O fluido folicular puncionado foi depositado em tubos cônicos de 15mL, permanecendo em repouso por 5 minutos para a sedimentação das células. O pellet formado foi transferido para uma placa de Petri

e o rastreamento dos CCOs foi feito em condições estéreis sob fluxo laminar, com auxílio de tubos capilares de vidro e lupa estereomicroscópica (Olympus S240).

Foram selecionados somente os CCOs grau I e grau II, segundo os critérios morfológicos de Leibfried e First (1979). Após a seleção foram lavados em meio TCM-199 suplementado com tampão HEPES, 11 mg/mL de piruvato, 50 µg/mL de gentamicina e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). E grupos de 20 a 30 CCOs foram colocados em placas de cultivo cobertas por óleo mineral estéril contendo microgotas de 100 µL de meio de MIV composto por TCM-199 suplementado com tampão bicarbonato de sódio, 10% de SFB (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 11 mg/mL de piruvato, 50 µg/mL de gentamicina, 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin, Bioniche Animal Health Belleville), e 5,0 µg/mL de LH (Lutropin, Bioniche Animal Health Belleville, Ont., Canada). Os CCOs foram maturados por 24 horas em incubadoras com temperatura de 38,5°C, e atmosfera úmida composta de 5% de CO₂, 20% de O₂ e 75% de N₂. A figura 8 resume as etapas de aspiração, seleção, e maturação *in vitro*.

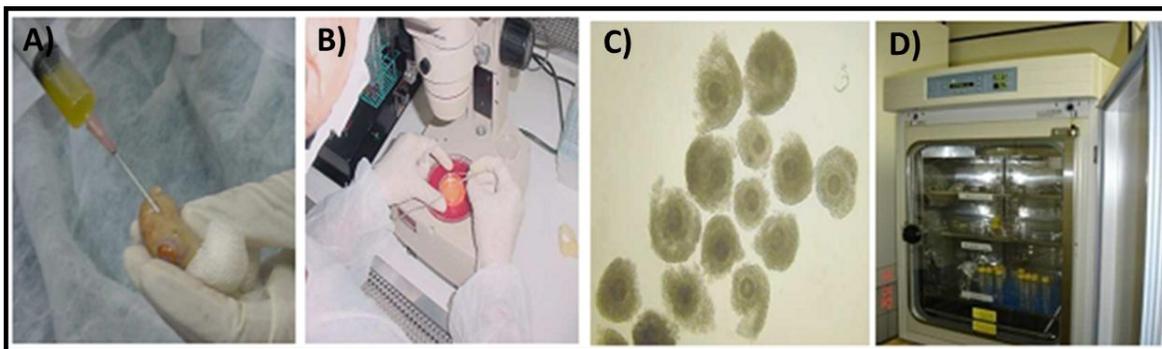


Figura 8: Fotografias mostrando as etapas de aspiração folicular (A), a seleção (B) do Complexo *Cumulus-Oócito* (C) feita sob estereomicroscópio e a maturação *in vitro* em estufa úmida com 38,5°C e 5% de CO₂ (D).

3.2.2 Fecundação *In vitro*

Os oócitos maduros foram transferidos para gotas com 80µL de meio TALP-FERT (Parrish et al., 1988) suplementado com heparina, penicilamina, epinefrina, e Albumina de Soro Bovino (BSA). O sêmen de um único touro (*Bos taurus taurus*) foi usado para todos os experimentos realizados. Para cada FIV, uma palheta de sêmen era descongelada a 35,0°C por 30 segundos e seu conteúdo depositado, cuidadosamente, sobre um gradiente descontínuo de Percoll (Lessley and Garner, 1983). A figura 9 ilustra o gradiente antes da centrifugação a 3.000 rpm, por 7 minutos, realizada para auxiliar a separação dos espermatozóides viáveis, ou seja, com motilidade adequada para atravessar as colunas alcançando o fundo do tubo.

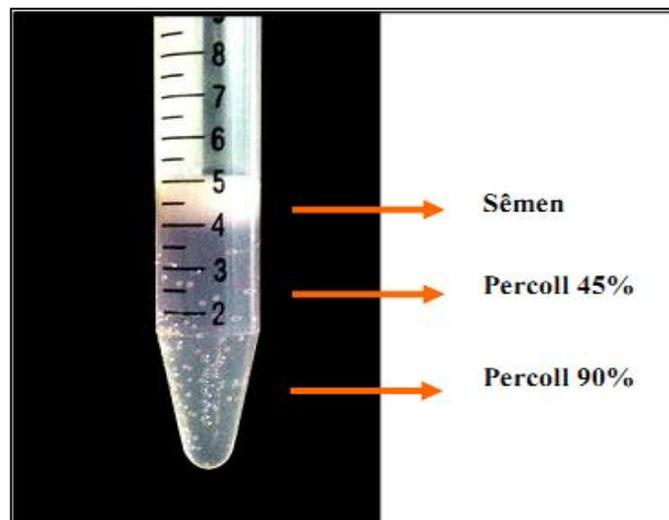


Figura 9: Fotografia mostrando o sêmen sobre gradiente descontínuo (45 e 90%, respectivamente) de Percoll. antes da centrifugação.

O sobrenadante contendo crioprotetor e espermatozóides imóveis foi descartado e o pellet, contendo os espermatozóides viáveis, foi lavado em meio TALP- FERT e centrifugado a 3.000 rpm por 3 minutos, para remoção dos resíduos de Percoll. Os oócitos foram incubados com uma concentração espermática ajustada para 2×10^6 de espermatozóides/mL, e permaneceram em incubadora com atmosfera úmida de 5% de CO₂ a 38.5°C por 24 horas.

3.2.3 Cultivo *In vitro*

Após 24 horas de fecundação, os prováveis zigotos foram submetidos à pipetagens sucessivas para retirada das células do *cumulus oophorus* e espermatozóides aderidos à zona pelúcida. Em seguida, foram transferidos para microgotas com 100 µL de meio SOF (Tervit et al., 1972), suplementado com 12 mg/mL de BSA, 50 µg/mL de gentamicina, e 5% de SFB, segundo modificações (Holm et al., 1999). A partir de então, os embriões foram incubados com Arginina e/ou L-NAME de acordo com o experimento e grupo experimental. Não foi utilizado sistema de co-cultivo com células da granulosa. Os embriões foram cultivados até o 8º dia de desenvolvimento, quando eram avaliados quanto às taxas de cinética, desenvolvimento e qualidade embrionária. A figura 10 mostra fotografias da placa de cultivo e morfologia embrionária no 8º dia de cultivo.

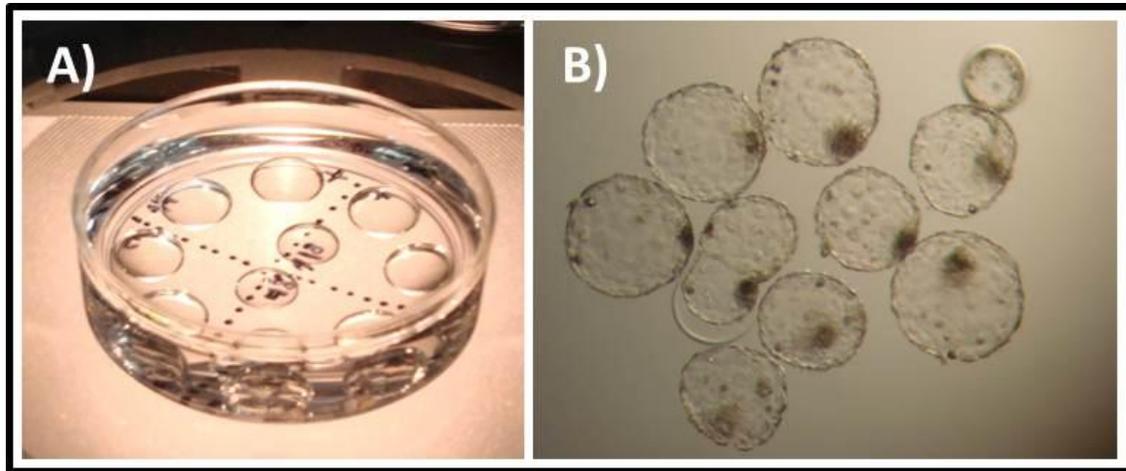


Figura 10: Fotografias mostrando as placa de cultivo (A), e blastocistos eclodidos no 8º dia de desenvolvimento (B).

3.2.4 Avaliação da Morfologia Embrionária

No 8º dia de desenvolvimento os embriões foram avaliados quanto às taxas de desenvolvimento, cinética e qualidade embrionária, de acordo com critérios estabelecidos pelo Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões - IETS (Stringfellow and Seidel, 1998).

No estágio de blastocisto, a zona pelúcida vai ficando cada vez mais fina, em função da pressão exercida pelo crescimento do embrião (que se dá por meio de expansão da blastocele e aumento do número de células) e pela ação de enzimas que digerem a zona pelúcida (Seshagiri et al., 2009). Por isso, a avaliação da cinética de desenvolvimento nesse estágio é baseada: no tamanho do embrião, expansão da blastocele, número de células e espessura da zona pelúcida. E tem as seguintes classificações: blastocisto inicial (BI), blastocisto blastocisto (BB), blastocisto expandido (BX) e blastocisto eclodido (BE).

Para a avaliação da qualidade embrionária os blastocistos foram classificados, em 3 graus de qualidade: grau 1 (excelente), 2 (bom/regular) e 3 (ruim). Os critérios morfológicos observados foram: cinética adequada ao dia de desenvolvimento, tamanho do embrião, número de células, definição da MCI, simetria e refringência dos blastômeros, expansão da blastocele, presença de vacúolos e fragmentação citoplasmática.

3.3 MEDIÇÃO DE METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO

A quantificação de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ no meio de cultivo foi feita pelo método colorimétrico de Griess (Ricart-Jane et al., 2002). A cada repetição as gotas em que os embriões foram cultivados (volume de 100 μL) foram armazenadas no 8º dia de cultivo em microtubos devidamente identificados conforme o grupo experimental, e estocados a -20°C , pelo período máximo de um mês até a dosagem. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

A curva padrão compreendeu valores entre 0 e 100 μM de nitrito (0, 2, 5, 10, 25, 50, 75 e 100 μM). Foi feita uma “solução mãe” de nitrito a 0,1 mM (com validade de seis meses) da qual era feita uma “solução de uso” a 0,01 mM no momento da montagem da curva. Os valores da curva eram obtidos diluindo a “solução de uso” em meio de CIV previamente armazenado. Pois, no momento da produção do meio, era separada uma fração para os experimentos de cultivo de

embrião e outra fração menor (aproximadamente 8mL) que ficava armazenada a -20°C e era destinada exclusivamente para a montagem da curva padrão.

Os valores da curva assim como as amostras (50 µL) foram colocadas em placas de 96 poços, aos quais foi adicionada a solução de Griess (50 µL). A solução era composta por Sulfanilamida a 2% e N-(1-naphthil) Etilenediamina a 0,2% diluída em água ultra-pura, somente no momento do uso devido serem fotossensíveis. Essas substâncias reagem a presença de NO_3^- / NO_2^- formando um composto azo cor púrpura que pode ser quantificado em comprimento de onda de 540 nm em leitor de Elisa (BIO-RAD 450).

3.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EMBRIONÁRIA

No 8º dia de cultivo foram selecionados os embriões blastocistos eclodidos, livres de zona pelúcida, apresentando características morfológicas indicativas de boa qualidade (Van Soom et al., 2003). Os embriões foram lavados três vezes em PBS contendo 0,1% (m/v) de álcool polivinílico (PVA) e transferidos em um volume de 5 µL de Micro Kit RNAeasy (Quiagen, Alemanha) para microtubos de 0,2 mL, contendo em média cinco embriões, que foram estocados em freezer a -20°C.

O RNA embrionário foi extraído de pools de 20 embriões utilizando o método do Trizol® de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida o pool de RNA foi submetido a transcrição reversa para a obtenção do DNA complementar (cDNA), sendo utilizado o kit High- Capacity cDNA Reverse

Transcription (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de cDNA foram armazenadas em freezer -20°C até o momento do uso.

O cDNA foi analisado utilizando um ensaio de quantificação relativa por PCR em tempo real (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems), usando Power SYBR-Green® PCR Master Mix (Applied Biosystems, Auckland, New Zealand). Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados no programa Primer3 e sintetizados pela Prodimol. A sequência dos oligonucleotídeos, número de pares de base, e número de acesso no GenBank dos genes alvo (IFN τ e OCT-4) e do controle endógeno (H2A) estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: O número de acesso dos genes IFN τ , OCT-4 e H2A.

Genes	Sequência de nucleotídeos	Tamanho (pb)	GenBank
IFNτ	TGCCTGGAACACCACCTC AGGTAGACATGGATAACCCTGGAAG	167	X 65539
OCT-4	GGTGTTTCAGCCAAACGACTATC TCTCTGCCTTGCATATCTCCTG	143 pb	NM 174580
H2A	AAAGCGTATTACCCCTCGTCA GAATCCAGGCATCCTTTAGACAG	166 pb	BC 109743

As reações foram feitas em triplicata, e a análise das eficiências de reação foi feita por método de $\Delta\Delta CT$ (Livak and Schmittgen, 2001), sendo consideradas para efeito de estudo, somente as eficiências entre 1,9 e 2.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As taxas de clivagem, formação de blastocisto, cinética do desenvolvimento e qualidade embrionária foram avaliadas por análise da variância, ANOVA, com pós-teste de Tukey, quando solicitado, e nível de significância de 5%. Todos os resultados estão expressos na forma de média \pm desvio padrão (dp).

As curvas padrão de NO₂/NO₃- em meio de cultivo, foram avaliadas por análise de regressão simples, sendo consideradas válidas as curvas com valores de R² acima de 98%. A correlação entre concentração de NO₂/NO₃- e cinética e qualidade embrionária, também foi feita por análise de regressão simples. Todas as análises citadas foram feitas no programa SigmaPlot® 11.0 (2000).

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1: L-NAME ANTES E APÓS O 4º DIA DE CULTIVO

O total de 5 repetições foram realizadas totalizando 696 oócitos distribuídos aleatória e igualmente entre os grupos experimentais. A tabela 2 mostra as taxas de desenvolvimento embrionário obtidas no Experimento 1.

Não foi observada diferença estatística das taxas de clivagem ($p > 0,05$) avaliada no 2º dia de cultivo. No 8º dia de cultivo o grupo LN1-8 apresentou a menor taxa de blastocisto ($29,4 \pm 3,72$, $p = 0,035$) comparado aos grupos SOF ($47,8 \pm 11,34$), LN1-4 ($39,7 \pm 11,05$) e LN4-8 ($35,1 \pm 8,16$).

Tabela 2: Taxas de Clivagem e Blastocisto do experimento 1.

Grupos	n ^(*)	Desenvolvimento embrionário (D2 e D8)	
		Clivagem ($\bar{X} \pm dp$)	Blastocisto ($\bar{X} \pm dp$)
SOF	180	$92,0 \pm 4,47$	$47,8 \pm 11,34^a$
LN1-4	183	$88,7 \pm 4,87$	$39,7 \pm 11,05^a$
LN4-8	166	$86,3 \pm 8,49$	$35,1 \pm 8,16^a$
LN1-8	167	$90,5 \pm 4,20$	$29,4 \pm 3,72^b$

(*) Número total de oócitos empregados.

^{a,b} Sobrescritos minúsculos indicam diferença significativa entre os grupos.

Os embriões obtidos no 8º dia de cultivo eram avaliados e classificados quanto a cinética de desenvolvimento e qualidade morfológica (Figura 11).

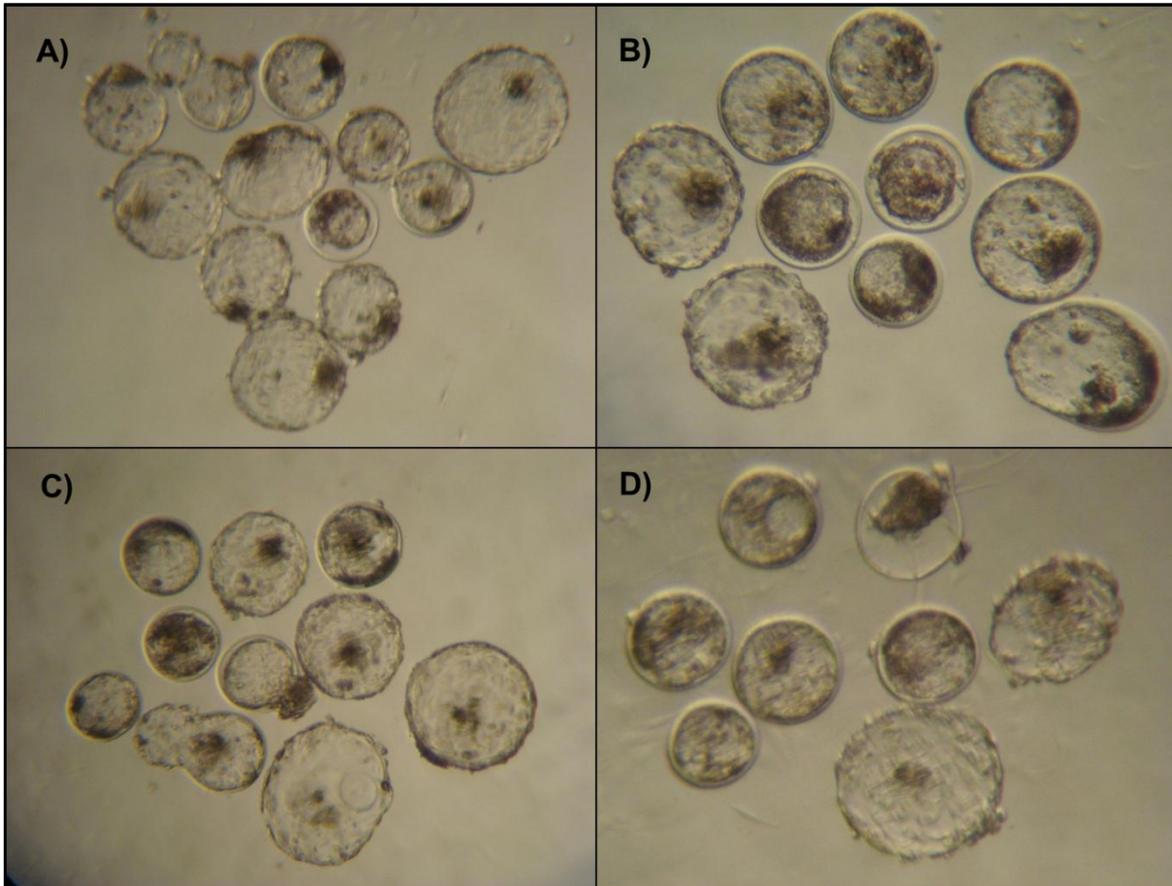


Figura 11: Fotomicrografias mostrando a morfologia embrionária, no 8º dia de cultivo, dos quatro grupos analisados no experimento 1. Pode-se visualizar a semelhança entre os embriões cultivados em meio SOF sem L-NAME (A), meio contendo 10mM de L-NAME do 1º ao 4º dia de cultivo, grupo LN1-4 (B) e do 4º ao 8º dia de cultivo, grupo LN4-8 (C). Mas os embriões cultivados com L-NAME do 1º ao 8º dia de cultivo, LN1-8 (D) mostraram menor número de blastocistos eclodidos e baixa qualidade embrionária quando comparado aos demais grupos (100X).

A cinética do desenvolvimento foi alterada com o uso de L-NAME a partir do 4º dia de cultivo (Tabela 3). Foram observadas menores taxas de eclosão nos grupos LN4-8 ($17,3 \pm 13,44$, $p=0,002$) e LN1-8 ($13,7 \pm 14,51$, $p=0,005$) em relação ao grupo controle ($48,3 \pm 11,05$), e aumento proporcional da taxa de embriões BL no grupo LN1-8 comparado ao grupo SOF ($52,5 \pm 11,96$ vs $27,9 \pm 5,27$, $p=0,035$).

Tabela 3: Taxas de Cinética do desenvolvimento no 8º dia de cultivo embrionário.

Grupos	n ^(*)	Classificação de Cinética do Desenvolvimento (D8)		
		Blastocisto ($\bar{X} \pm dp$)	BL Expandido ($\bar{X} \pm dp$)	BL Eclodido ($\bar{X} \pm dp$)
SOF	65	27,9 ± 5,27 ^{Aab}	23,8 ± 10,87 ^{Aa}	48,3 ± 11,05 ^{Ab}
LN1-4	67	31,1 ± 6,70 ^{ABa}	35,4 ± 17,98 ^{Aa}	33,5 ± 20,09 ^{ABa}
LN4-8	55	35,8 ± 3,17 ^{ABab}	46,9 ± 11,57 ^{Aa}	17,3 ± 13,44 ^{Bb}
LN1-8	44	52,5 ± 11,96 ^{Ba}	39,6 ± 8,20 ^{Aa}	13,7 ± 14,51 ^{Bb}

(*) Número total de embriões produzidos.

^{A,B} Sobrescritos maiúsculos indicam diferença significativa entre os grupos na mesma classificação de cinética.

^{a,b} Sobrescritos minúsculos indicam diferença significativa entre as classificações dentro de cada grupo experimental.

Os valores em graus de qualidade estão mostrados na tabela 4. De forma similar ao SOF, o grupo LN1-4 teve maior proporção de embriões qualidade Grau 1 (61,0% ± 11,11) do que Grau 2 (17,6% ± 15,27, $p=0,002$) e Grau 3 (21,4% ± 16,59, $p=0,005$). Não foi observada diferença estatística ($p>0,05$) entre os graus no grupo LN4-8. O cultivo ininterrupto com L-NAME, grupo LN1-8, apresentou taxa significativamente maior ($p<0,001$) de embriões Grau 3 (81,5% ± 5,44) comparado aos grupos SOF, LN1-4 e LN4-8 (17,1% ± 9,04; 21,4 ± 16,59 e 27,7 ± 9,35, respectivamente). E proporcionalmente menor taxa de embriões Grau 1 comparado ao grupo controle (16,4 ± 12,13 vs 58,7 ± 12,13, $p=0,003$).

Tabela 4: Análise da morfologia embrionária analisada no 8º dia de cultivo.

Avaliação Morfológica				
Grupos	n ^(*)	Grau 1 ($\bar{X} \pm dp$)	Grau 2 ($\bar{X} \pm dp$)	Grau 3 ($\bar{X} \pm dp$)
SOF	50	58,7 ± 12,13 ^{Aa}	24,1 ± 18,57 ^{Ab}	17,1 ± 9,04 ^{Ab}
LN1-4	33	61,0 ± 11,11 ^{Aa}	17,6 ± 15,27 ^{Ab}	21,4 ± 16,59 ^{Ab}
LN4-8	46	46,4 ± 20,86 ^{ABa}	25,9 ± 20,90 ^{Aa}	27,7 ± 9,35 ^{Aa}
LN1-8	13	16,4 ± 8,96 ^{Ba}	2,1 ± 3,61 ^{Aa}	81,5 ± 5,44 ^{Bb}

(*) Número total de embriões produzidos.

^{A,B} Sobrescritos maiúsculos indicam diferença significativa entre os grupos no mesmo grau de qualidade embrionária

^{a,b} Sobrescritos minúsculos indicam diferença significativa entre os graus dentro de cada grupo.

A medição de Nitrato/Nitrito no meio em que os embriões foram cultivados até o 8º dia de desenvolvimento, foi realizada em triplicata (tabela 5). O grupo SOF teve maior produção total de metabólitos (2,10uM), e os grupos LN1-4, LN4-8 e LN1-8, cultivados na presença do inibidor de NOS, apresentaram menores quantidades (1,54uM, 0,58uM e 1,24uM, respectivamente).

Tabela 5: Concentração de Nitrato/Nitrito medidos em meio do 8º dia de cultivo. Concentração total e dividida pelo número de embriões produzidos no experimento 1.

Grupos	n (embriões produzidos)	Concentração de Nitrato/Nitrito (uM)	
		Total ($\bar{X} \pm dp$)	Produzida por embrião ($\bar{X} \pm dp$)
SOF	54	2,10 ± 0,93	0,13 ± 0,08
LN14	44	1,54 ± 0,59	0,11 ± 0,06
LN48	47	0,68 ± 0,59	0,04 ± 0,03
LN18	39	1,24 ± 0,26	0,10 ± 0,02

$p > 0,05$

A produção individual de metabólitos por embrião mostrou que a presença do L-NAME do 4º ao 8º dia de cultivo, LN4-8, apresentou a menor concentração de metabólitos ($0,04\mu\text{M} \pm 0,03$), indicando a inibição do sistema NO^- neste período. Os grupos LN1-4 e LN1-8, por sua vez, apresentaram produção por embrião ($0,11\mu\text{M}$ e $0,10\mu\text{M}$, respectivamente) similar ao grupo SOF controle ($0,13\mu\text{M}$). O que pode indicar a existência de um mecanismo compensatório diante da inibição do sistema NO^- em estágio inicial de desenvolvimento (LN1-4). Ou mesmo diante de cultivo com inibição prolongada (LN1-8).

4.2 EXPERIMENTO 2: CURVA DOSE RESPOSTA DE ARGININA

Foram realizadas 4 repetições empregando cerca de 30 oócitos por grupo, a cada repetição, totalizando 559 oócitos utilizados no experimento 2. As taxas de clivagem foram avaliadas nos dias 1, 2 e 4 de cultivo, correspondendo a 0, 24 e 72 horas de tratamento com arginina no cultivo (Tabela 6). Em D1 os grupos não diferiram em taxa de clivagem ($p > 0,05$). Em D2 houve aumento significativo das taxas de embriões clivados ($p < 0,001$) em todos os grupos, que também não diferiram entre si ($p > 0,05$). Em D4, o uso de 50mM de arginina resultou em taxa significativamente menor ($p < 0,001$) de embriões clivados com mais de 16 células ($43,0 \pm 6,26$) comparado ao grupo controle ($75,7 \pm 4,30$).

Tabela 6: Taxas de Clivagem em D1 (0 hora), D2 (24 horas) e D4 (72 horas) de cultivo em meio contendo diferentes concentrações de L-arginina.

Grupos	n ^(*)	Taxas de Clivagem		
		D1 ($\bar{X} \pm dp$)	D2 ($\bar{X} \pm dp$)	D4 ($\bar{X} \pm dp$)
CT	118	42,2 ± 9,24 ^{Ba}	78,3 ± 11,53 ^{Ab}	75,7 ± 4,30 ^{Ab}
Gln	112	40,8 ± 8,05 ^{Ba}	64,8 ± 10,97 ^{Ab}	57,9 ± 9,19 ^{ABb}
1mM	110	36,6 ± 5,20 ^{Ba}	79,4 ± 3,21 ^{Ab}	63,8 ± 9,88 ^{Ac}
10mM	123	39,5 ± 5,76 ^{Ba}	70,5 ± 10,12 ^{Ab}	60,4 ± 8,44 ^{ABb}
50mM	96	41,7 ± 9,08 ^{Ba}	67,0 ± 8,11 ^{Ab}	43,0 ± 6,26 ^{Ba}

(*) Número total de oócitos empregados.

^{A,B} Maiúsculos indicam diferença significativa entre os grupos no mesmo dia de clivagem.

^{a,b,c} Minúsculos indicam diferença significativa entre os dias de clivagem dentro de cada grupo.

A tabela 7 mostra que a suplementação do meio de cultivo com arginina a 1mM ou 10mM não alterou as taxas de blastocisto ($p > 0,05$) ficando similares ao grupo controle CT ($48\% \pm 13,03$ e $34,2\% \pm 3,92$ vs $49,4\% \pm 4,82$, respectivamente), enquanto o uso de 50mM diminuiu significativamente ($p < 0,001$) a taxa de blastocisto ($10,7 \pm 7,24$).

Tabela 7: Taxas de Blastocisto do experimento 2.

Grupos	Blastocisto ($\bar{X} \pm dp$)
CT	$49,4 \pm 4,82^a$
Gln	$37,3 \pm 2,99^a$
1mM	$48,0 \pm 13,02^a$
10mM	$34,2 \pm 3,92^a$
50mM	$10,7 \pm 7,24^b$

^{a,b} Sobrescritos minúsculos indicam diferença significativa entre os grupos.

A Figura 12 ilustra o resultado expresso acima, pois se observa a semelhança quanto ao número de blastocistos obtidos nos grupos experimentais com 2mM de glutamina e 1mM e 10mM de arginina em relação ao grupo controle. Sendo que o cultivo com 50mM de arginina mostrou grande quantidade de embriões degenerados.

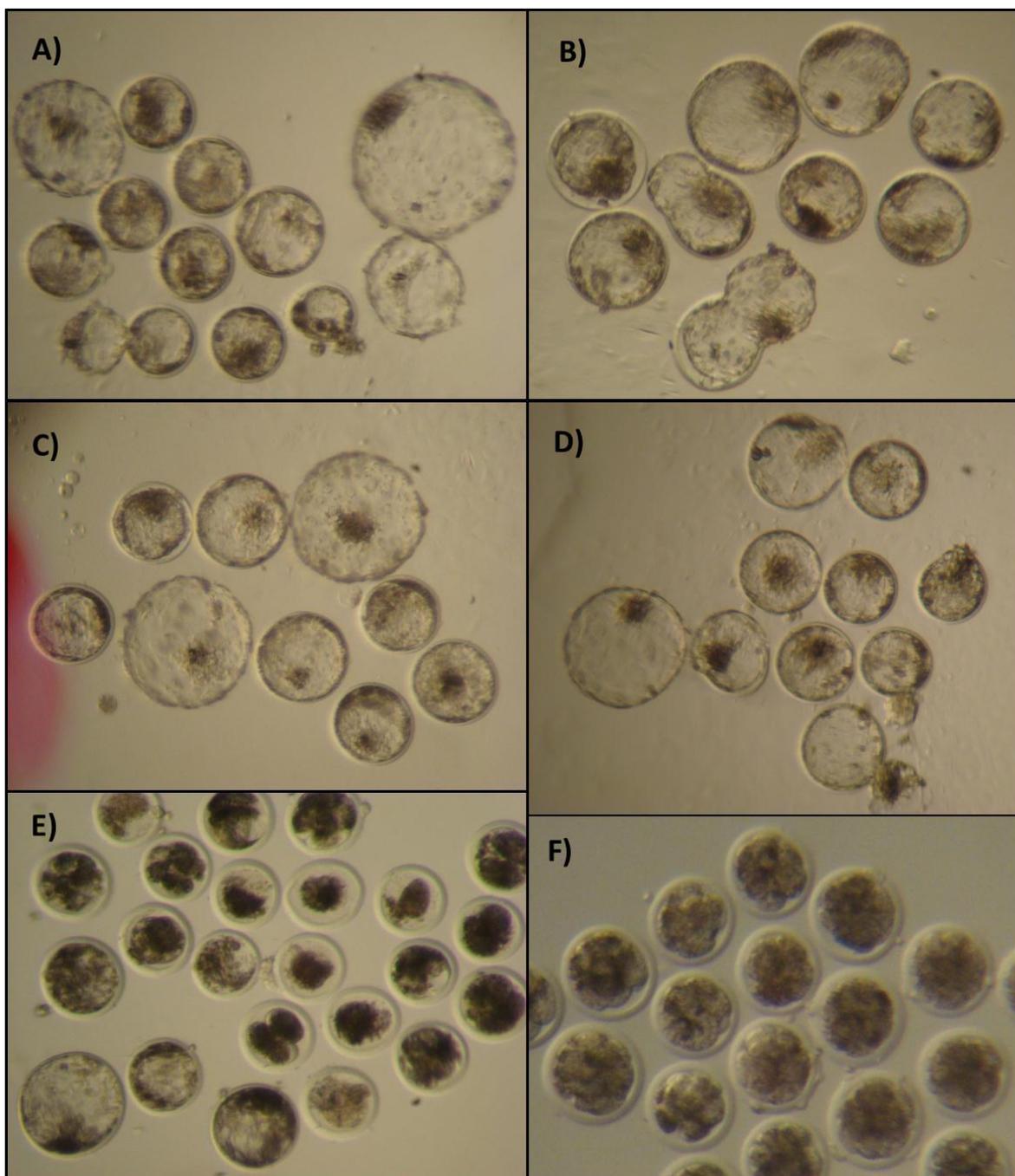


Figura 12: Fotomicrografias mostrando a morfologia embrionária, no 8^o dia de cultivo, dos cinco grupos analisados no experimento 2. Pode-se visualizar a semelhança entre os embriões cultivados em meio sem Arg nem Gln (A), em meio contendo 2mM de Gln, grupo Gln (B), 1mM de Arg (C) e 10mM de Arg (D). No entanto, embriões cultivos com 50mM de Arg (E) tiveram desenvolvimento prejudicado. Exemplo de embriões clivados com mais de 16 células, no 4^o dia de cultivo (F). Aumento de 100x.

Os embriões obtidos no 8º dia de cultivo foram também avaliados quanto a cinética de desenvolvimento e qualidade morfológica. A tabela 8 mostra que a adição de 1mM ou 10mM de Arginina durante todo o cultivo *in vitro*, não alterou as taxas de cinética do desenvolvimento em relação aos grupos controle CT e Gln ($p>0,05$). Mas o uso de 50mM prejudicou gravemente a taxa de eclosão ($p<0,001$).

Tabela 8: Taxas de Cinética do desenvolvimento no 8º dia de cultivo embrionário.

Grupos	n ^(*)	Classificação de Cinética do desenvolvimento (D8)		
		Blastocisto ($\bar{X}\pm dp$)	BL Expandido ($\bar{X}\pm dp$)	BL Eclodido ($\bar{X}\pm dp$)
CT	59	27,8 ± 12,34 ^{ABa}	28,6 ± 2,82 ^{Aa}	43,6 ± 9,62 ^{Aa}
Gln	41	8,2 ± 7,74 ^{Aa}	55,3 ± 10,68 ^{Ab}	36,5 ± 7,84 ^{Ab}
1mM	54	25,5 ± 6,78 ^{Aba}	36,4 ± 8,34 ^{Aa}	38,1 ± 14,31 ^{Aa}
10mM	42	12,0 ± 0,80 ^{Aba}	47,7 ± 19,95 ^{Ab}	40,3 ± 19,69 ^{Ab}
50mM	11	40,0 ± 24,04 ^{Ba}	53,3 ± 17,64 ^{Aa}	0,0 ± 0,0 ^{Bb}

(*) Número total de embriões produzidos.

^{A,B} Sobrescritos maiúsculos indicam diferença significativa entre os grupos na mesma classificação de cinética.

^{a,b} Sobrescritos minúsculos indicam diferença significativa entre as classificações dentro de cada grupo experimental.

A tabela 9 mostra que 1mM de Arginina aumentou a proporção de embriões qualidade Grau 1 dentro do grupo ($57,5\% \pm 14,58$, $p=0,009$), semelhante ao grupo controle com L-glutamina ($62\% \pm 17,36$, $p=0,002$). O uso de 50mM diminuiu significativamente ($p=0,002$) a taxa de embriões Grau 1 ($13,3\% \pm 16,33$).

Tabela 9: Avaliação morfológica dos embriões no 8º dia de desenvolvimento.

Avaliação morfológica (D8)			
Grupos	Grau 1 ($\bar{X} \pm dp$)	Grau 2 ($\bar{X} \pm dp$)	Grau 3 ($\bar{X} \pm dp$)
CT	$52,0 \pm 8,62$ ^{Aa}	$25,5 \pm 8,27$ ^{Aa}	$22,6 \pm 15,69$ ^{Aa}
Gln	$62,0 \pm 17,36$ ^{Aa}	$16,6 \pm 7,36$ ^{Ab}	$21,4 \pm 19,25$ ^{Ab}
1mM	$57,5 \pm 14,58$ ^{Aa}	$19,4 \pm 6,08$ ^{Ab}	$23,0 \pm 14,98$ ^{Ab}
10mM	$50,3 \pm 12,44$ ^{Aa}	$24,0 \pm 16,80$ ^{Aa}	$25,7 \pm 27,32$ ^{Aa}
50mM	$13,3 \pm 16,33$ ^{Ba}	$18,3 \pm 21,34$ ^{Aab}	$43,3 \pm 31,51$ ^{Ab}

(*) Número total de embriões produzidos.

^{A,B} Sobrescritos maiúsculos indicam diferença significativa entre os grupos no mesmo grau de qualidade embrionária.

^{a,b} Sobrescritos minúsculos indicam diferença significativa entre os graus dentro de cada grupo.

4.3 EXPERIMENTO 3: NO⁻ E O PERÍODO DO 5^o AO 8^o DIA DE CULTIVO

Foram realizadas 4 repetições para o experimento 3 (tabela 10). Foi empregada a concentração de 1mM de arginina (definida no experimento 2), adicionada ao meio de cultivo no 5^o até o 8^o dia de cultivo. Não foi observada diferença ($p>0,05$) entre as taxas de blastocisto dos grupos Gln ($50,2\% \pm 4,9$) e Arg ($49,4 \pm 6,5$) e o grupo CT, sem glutamina nem arginina ($49,4 \pm 4,8$).

Tabela 10: Taxas de Blastocisto do experimento 3.

Grupos	n ^(*)	Blastocisto ($\bar{X} \pm dp$)
CT	118	$49,4 \pm 4,8$
Gln	100	$50,2 \pm 4,9$
Arg	94	$49,4 \pm 6,5$

(*) Número total de oócitos empregados. ($p>0,05$).

A Figura 13 ilustra o resultado relatado acima, pois se observa a semelhança do número de blastocistos obtidos nos grupos citados. Pode se observar também a cinética de desenvolvimento e qualidade morfológica. No 8^o dia de cultivo todos os grupos tiveram formação de blastocistos eclodidos (estágio correspondente ao período de cultivo avaliado). Os dados estatísticos são mostrados a seguir.

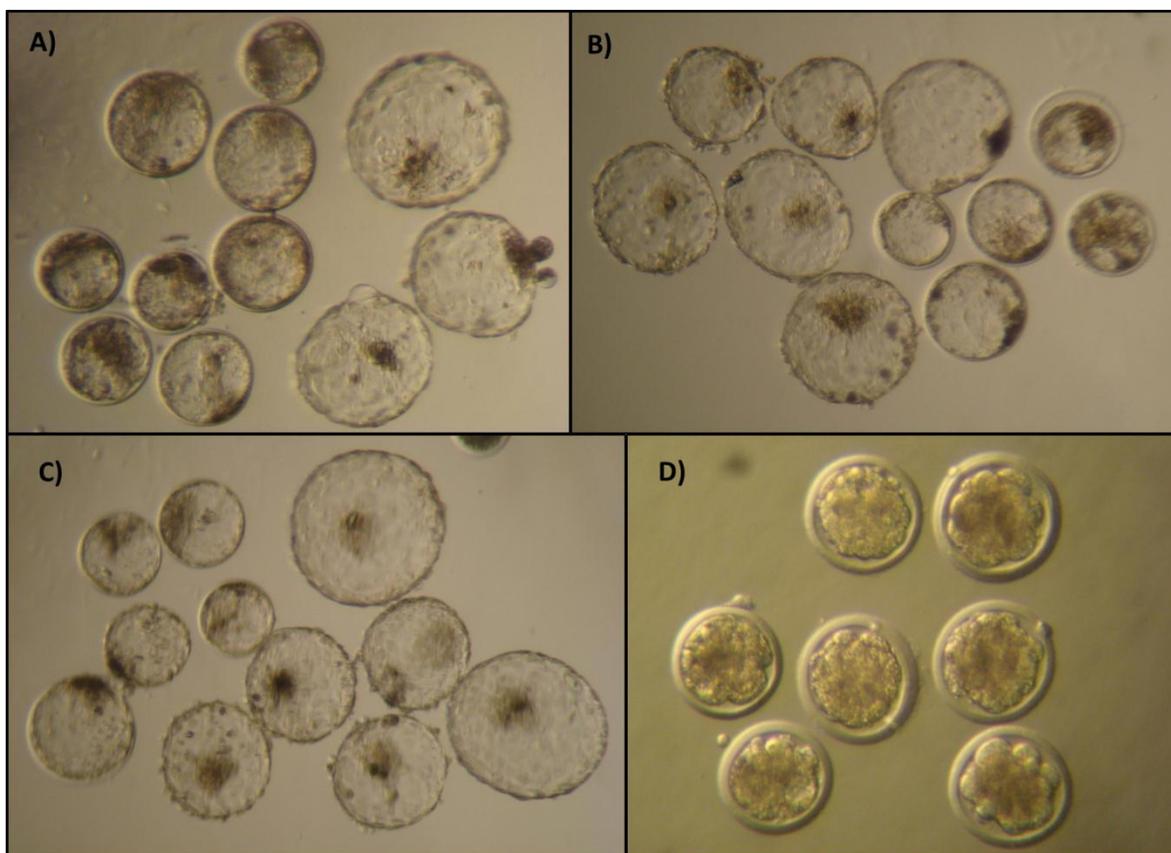


Figura 13: Fotomicrografias mostrando a morfologia embrionária, no 8º dia de cultivo, dos três grupos analisados no experimento 3. Pode-se observar a morfologia e ocorrência de eclosão entre os embriões cultivados do 5º ao 8º dia de cultivo em meio controle sem Arg nem Gln (A), em meio contendo 2mM de Gln (B), e 1mM de Arg (C). Exemplo da morfologia embrionária no 5º dia de cultivo correspondente ao estágio de mórula (D), momento em que Gln ou Arg foram adicionadas ao meio. Aumento de 100x.

As tabelas 11 e 12 mostram as taxas de cinética e de qualidade embrionária, respectivamente. A adição de Arginina a 1mM, do 5º ao 8º dia de cultivo, aumentou a taxa de embriões eclodidos ($p=0,036$) comparado ao grupo CT ($64,8\% \pm 6,9$ vs $41,4\% \pm 11,47$). Assim como aumentou a taxa de embriões qualidade Grau 1 ($p=0,001$) comparado ao grupo CT ($84,8\% \pm 2,63$ vs $52\% \pm 8,62$).

Tabela 11: Taxas de Cinética do desenvolvimento no 8º dia de cultivo.

Classificação de Cinética do desenvolvimento (D8)				
Grupos	n ^(*)	Blastocisto ($\bar{X} \pm dp$)	BL Expandido ($\bar{X} \pm dp$)	BL Eclodido ($\bar{X} \pm dp$)
CT	59	27,8 ± 12,34 ^{Aa}	30,8 ± 3,15 ^{Aa}	41,4 ± 11,47 ^{Aa}
Gln	50	7,6 ± 5,10 ^{Aa}	39,7 ± 15,74 ^{Ab}	52,7 ± 19,19 ^{ABb}
Arg	47	10,1 ± 6,87 ^{Aa}	25,1 ± 11,33 ^{Aa}	64,8 ± 6,90 ^{Bb}

(*) Número total de embriões produzidos.

^{A,B} Sobrescritos maiúsculos indicam diferença significativa entre os grupos na mesma classificação de cinética.

^{a,b} Sobrescritos minúsculos indicam diferença significativa entre as classificações dentro de cada grupo experimental.

Tabela 12: Avaliação morfológica no 8º dia de desenvolvimento embrionário.

Avaliação Morfológica (D8)			
Grupos	Grau 1 ($\bar{X} \pm dp$)	Grau 2 ($\bar{X} \pm dp$)	Grau 3 ($\bar{X} \pm dp$)
CT	52,0 ± 8,62 ^{Aa}	25,5 ± 8,27 ^{Aab}	22,6 ± 15,69 ^{Ab}
Gln	60,0 ± 17,18 ^{ABa}	17,6 ± 15,63 ^{Ab}	11,7 ± 11,08 ^{Ab}
Arg	84,8 ± 2,63 ^{Ba}	8,6 ± 6,39 ^{Ab}	5,4 ± 3,67 ^{Ab}

(*) Número total de embriões produzidos.

^{A,B} Sobrescritos maiúsculos indicam diferença significativa entre os grupos no mesmo grau de qualidade embrionária.

^{a,b} Sobrescritos minúsculos indicam diferença significativa entre os graus dentro de cada grupo.

A medição de metabólitos de NO_3^- , Nitrito e Nitrato, em meio de cultivo foi realizada em duplicata (tabela 13). A produção total de metabólitos pelos embriões do grupo CT variou de 1,68uM (medida em D5) até 2,10uM (medida em D8). A adição de L-glutamina (2mM) e Arginina (1mM) de D5 até D8, aumentou a produção total de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ para 3,64uM e 4,35uM, respectivamente. E também aumentou a produção de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ por embrião (0,40uM e 0,35uM, respectivamente) comparado ao grupo controle (0,08uM).

Tabela 13: Concentração de Nitrato/Nitrito total medida em gotas de cultivo. Dividida pelo número de embriões produzidos em cada grupo, e medida em gotas do co-cultivo de células da granulosa.

	Concentração de Nitrato/Nitrito (uM)		
	Total ($\bar{X} \pm dp$)	Total / embrião ($\bar{X} \pm dp$)	Granulosa ($\bar{X} \pm dp$)
D15 (-)	1,68 ± 0,76	-	-
CT	2,60 ± 0,47	0,08 ± 0,00	-
Gln	3,64 ± 0,51 ^A	0,35 ± 0,02	-0,29 ± 0,00 ^B
Arg	4,35 ± 2,02 ^A	0,40 ± 0,06	0,79 ± 1,01 ^B

^{A,B} Sobrescritos maiúsculos indicam diferença significativa entre as medições de nitrato/nitrito no mesmo grupo experimental.

Em um experimento paralelo, foi medida em triplicata a concentração de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ no meio em que foram cultivadas somente células da granulosa, com formação de mono-camada. A produção de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ foi significativamente maior ($p=0,006$) nos cultivos de embrião do que nos de células da granulosa submetidas aos mesmos meios e condições de cultivo embrionário (tabela 13).

A produção de metabólitos $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ por embrião teve relação diretamente proporcional com a taxa de blastocisto eclodido ($R^2=96,4\%$, $p<0,001$) e de embriões qualidade Grau 1 ($R^2=75,5\%$, $p=0,025$). Quanto maior a concentração de metabólitos maior foi a taxa de eclosão (Figura 14) e qualidade embrionária (Figura 15).

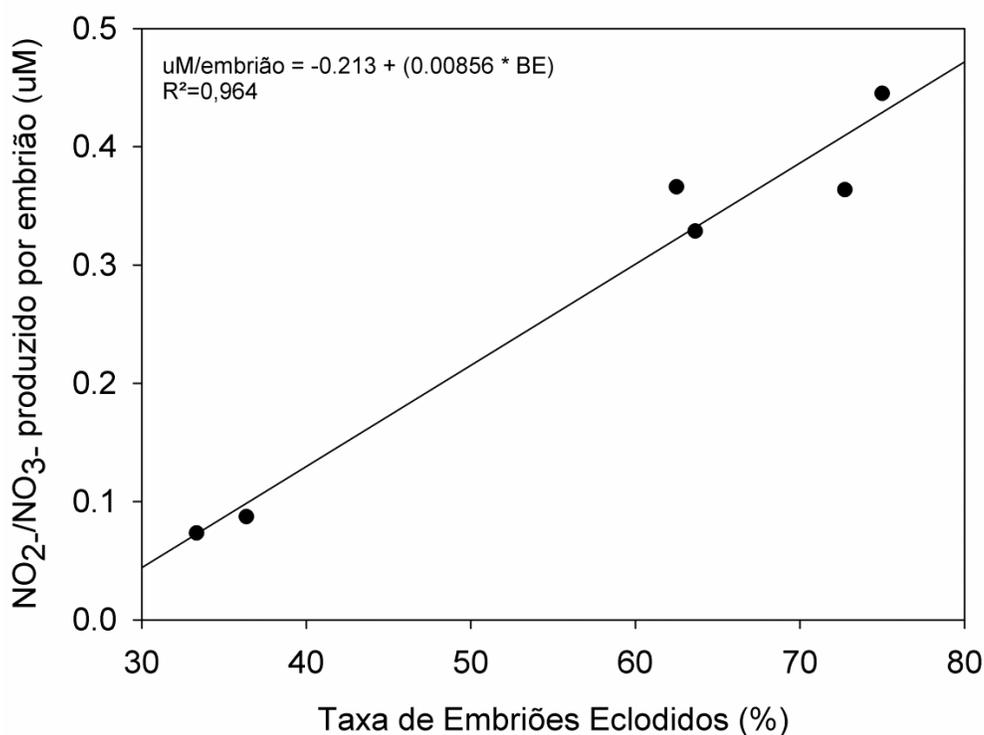


Figura 14: Curva de Regressão mostrando a relação diretamente proporcional entre a taxa de eclosão de embriões bovinos tratados do 5º ao 8º dia de cultivo, e a concentração de Nitrito/Nitrato produzida por embrião (uM). Os pontos pretos ao longo da reta de tendência representam os valores da média de concentração de metabólitos (medida em duplicata) dos grupos do experimento 3.

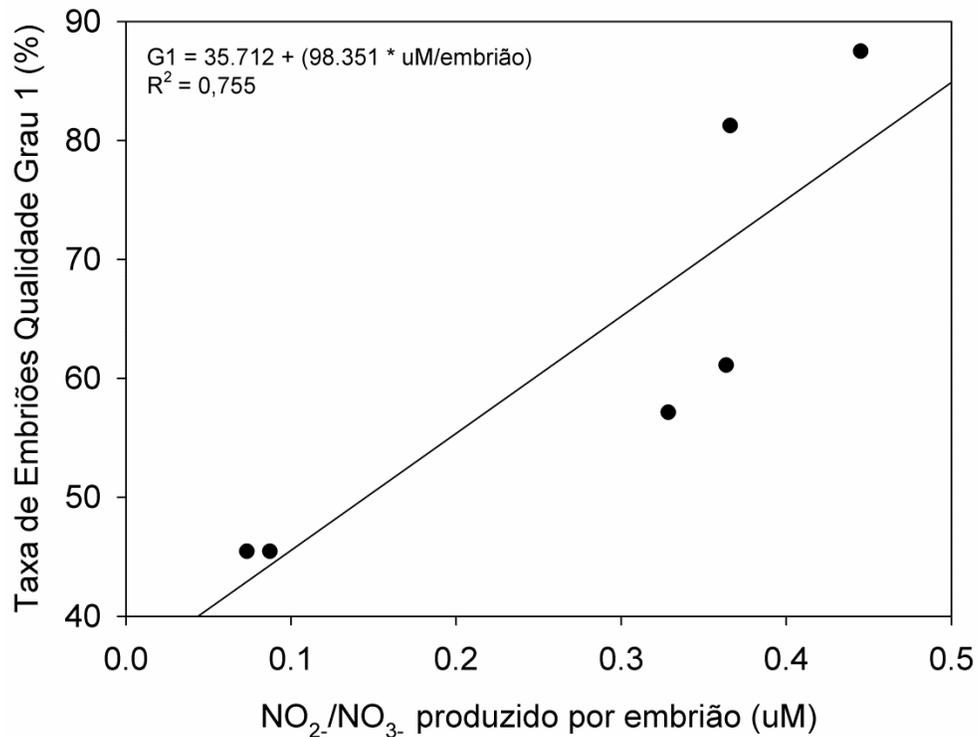


Figura 15: Curva de Regressão mostrando a relação diretamente proporcional entre a concentração de Nitrito/Nitrato produzidos por embrião (uM) e a taxa de blastocistos qualidade Grau 1 de tratados do 5^o ao 8^o dia de cultivo. Os pontos pretos ao longo da reta de tendência representam a média da taxa de embriões Grau 1 (repetições correspondentes às amostras dosadas) obtidas nos 3 grupos do experimento 3 (CT, Gln a Arg).

4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

A análise da expressão dos transcritos gênicos de OCT-4 e interferon- γ foram analisados em embriões cultivados *in vitro* em meio contendo glutamina (GLN), arginina (ARG), e arginina e L-NAME simultaneamente (ARG/LN), somente a partir do 5^o dia de desenvolvimento (experimento 3). O grupo glutamina foi usado como controle e calibrador para os cálculos de $\Delta\Delta\text{CT}$.

A inibição da produção de NO- não influenciou a expressão do gene OCT-4 ($p=0,168$) expresso na MCI (Figura 16). Mas influenciou a de INT-t, expresso nas células trofoblásticas (Figura 17), pois com o uso de L-NAME, mesmo com adição simultânea de arginina (ARG/LN), foi observada expressão de 1,8x e 1,5x menor comparada aos grupos glutamina e arginina ($p=0,002$), respectivamente.

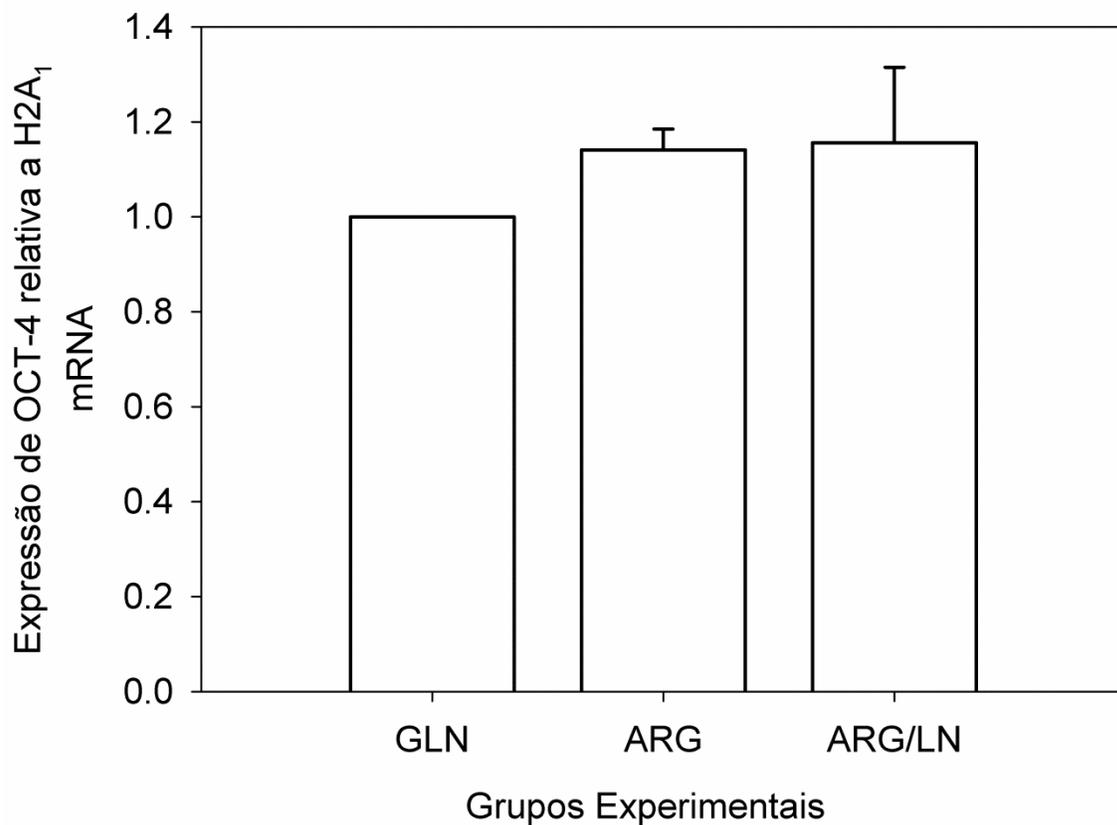


Figura 16: Expressão relativa dos transcritos do gene Oct-4 em embriões cultivados *in vitro* em meio contendo aminoácidos somente a partir do 5º dia de desenvolvimento. Expressão de Oct-4 foi similar nos cultivos contendo somente glutamina (GLN), arginina (ARG), ou arginina e L-NAME simultaneamente (ARG/LN), $p>0,05$. Resultados expressos em média \pm DP.

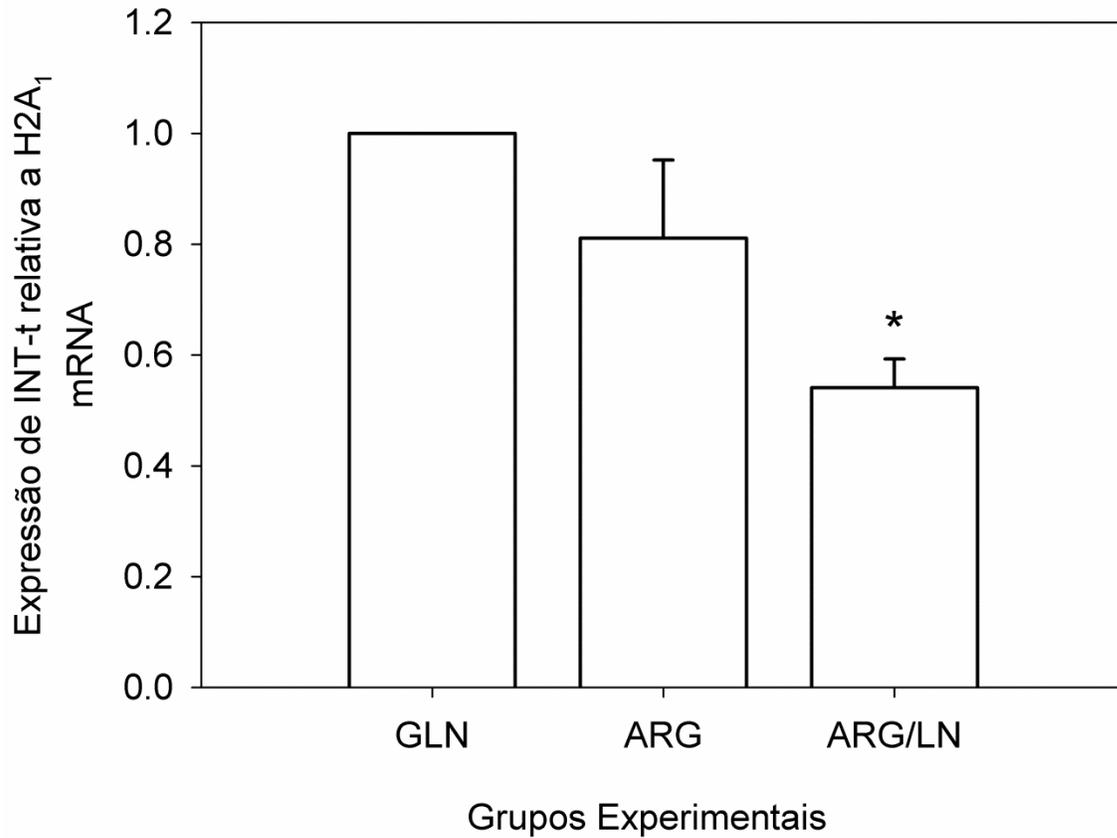


Figura 17: Expressão relativa dos transcritos do gene Interferon-t em embriões cultivados *in vitro* em meio contendo aminoácidos somente a partir do 5º dia de desenvolvimento. Expressão de Int-t em embriões cultivados com arginina e L-NAME simultaneamente (ARG/LN) diferiu significativamente do cultivo somente com glutamina (GLN), e arginina (ARG). O asterisco indica diferença estatística ($p < 0,05$). Resultados expressos em média \pm DP.

5 DISCUSSÃO

5.1 O EFEITO DOSE DEPENDENTE DO SISTEMA ARGININA/NO⁻ SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

A abordagem de inibição com L-NAME em diferentes momentos do cultivo foi usada para investigar a importância do NO⁻ durante o desenvolvimento pré-implantacional de embriões bovinos, particularmente no período da ativação do genoma embrionário. Pois diversos estudos utilizando L-NAME no cultivo *in vitro* de embriões de camundongos (Barroso et al., 1998; Gouge et al., 1998; Chen et al., 2001; Kim et al., 2004; Manser et al., 2004), relataram o bloqueio do desenvolvimento no estágio entre 2 e 4 células. E outro estudo, com bovinos, relatou bloqueio entre 8 a 16 células (Tsfaye et al., 2006). Ambos os estágios coincidem com o período de ativação do genoma embrionário das duas espécies (Telford et al., 1990).

Neste trabalho observamos que a inibição do sistema arginina/NO⁻ teve efeito negativo mais pronunciado após o D4 de cultivo, período de ativação do genoma, quando a eclosão e qualidade embrionária foram prejudicadas, mas não a taxa de blastocisto. Esta foi prejudicada somente na inibição durante todo o cultivo (D1-D8), mas não foi inibida quase por completo, como Tsfaye et al. (2006) relatou anteriormente usando a mesma concentração de L-NAME (10mM), mas o meio de cultivo CR1. Nesse sentido, é difícil comparar os efeitos do L-

NAME com outros trabalhos, haja vista os diferentes sistemas de cultivo utilizados que podem variar na disponibilidade de substratos do sistema arginina/ NO^- , e logo na sensibilidade dos embriões a inibição por L-NAME.

Da mesma forma, a inibição com L-NAME nos estágios precedentes a ativação do genoma não afetou nenhum dos parâmetros de desenvolvimento embrionário, exceto, sensivelmente, a eclosão. Provavelmente porque o prejuízo causado pela inibição nesse período pôde ser amenizado pelo período de cultivo posterior sem inibição. Esses resultados evidenciam que o funcionamento do sistema arginina/ NO^- é necessário durante todo o desenvolvimento pré-implantacional bovino, e principalmente no período posterior a ativação do genoma embrionário, no qual a inibição do sistema prejudica a cinética, qualidade e inclusive a taxa de produção de blastocisto.

É bem conhecida a importância do uso de aminoácidos durante o cultivo, pois concentrações mínimas são requeridas para dar suporte ao desenvolvimento embrionário (Gardner and Lane, 1997). Em camundongos, por exemplo, os aminoácidos essenciais aumentam a taxa de clivagem após o estágio de 8 células, associando divisões celulares mais rápidas e maior número de células (Biggers and Summers, 2008). Todavia ainda não estão esclarecidos os mecanismos de ação pelos quais os aminoácidos promovem a melhoria do desenvolvimento. Sabe-se, porém, que atuam através de vários mecanismos, como de osmoregulação e de sinalização celular (Van Winkle, 2001).

A arginina e a glutamina são exemplos de aminoácidos semi-essencial e essencial, respectivamente, sendo ambos precursores na síntese de NO^- , um importante sinalizador celular (Moncada e Higgs, 1995). Dentro do nosso

conhecimento, esse foi o primeiro trabalho a adicionar arginina, o precursor natural de NO^- , ao cultivo *in vitro* de embriões bovinos. Diferentes concentrações foram adicionadas visando a melhoria das taxas de desenvolvimento embrionário. A arginina demonstrou agir aumentando a produção de NO^- por embrião, o que por sua vez esteve diretamente relacionado a cinética e qualidade embrionária, demonstrando a importância do sistema arginina/ NO^- na regulação do metabolismo de embriões bovinos pré-implantacionais.

Há evidências que suportam o papel do NO^- em modular tanto a glicólise quanto a fosforilação oxidativa. Sabe-se que pode inibir de forma reversível a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, enzima importante da glicólise (Broniowska and Hogg, 2010), mas os efeitos disso no embrião não são bem entendidos. E também inibe de forma reversível, a Citocromo C Oxidase, pois compete pelo sítio do oxigênio, diminuindo a fosforilação oxidativa e, logo, a produção de ATP. Ao mesmo tempo, também diminui o consumo de oxigênio, e a produção de EROS, o que contribui para a proteção embrionária contra danos oxidativos (Manser and Houghton, 2006).

Evidências recentes tem proposto um modelo metabólico para o desenvolvimento embrionário, baseado nas semelhanças entre o perfil metabólico de células embrionárias e cancerígenas (Redel et al., 2012). Nesse modelo, o uso preferencial da glicólise aeróbia e concomitante redução da fosforilação oxidativa mitocondrial (efeito Warburg), força a geração de biomassa (nucleotídeos, aminoácidos e lipídios) a partir da glicose em detrimento da produção de ATP, que seria reduzida (Vander Heiden et al., 2009). No entanto, a biomassa gerada em larga escala atuaria como matéria-prima para novas células, resultando em

proliferação celular acelerada, o que consistiria em uma adaptação metabólica vantajosa para o embrião em desenvolvimento (Krisher and Prather, 2012). Considerando que o NO^- tem papel na regulação de ambas as vias (glicólise e fosforilação), novas evidências que suportem este modelo metabólico, também servirão para elucidar o papel do NO^- como uma molécula pivô para a adaptação aos mecanismos metabólicos, que resulta em sinalização para proliferação celular e melhoria da qualidade embrionária.

Embora tenha melhorado a cinética e qualidade embrionária, o esperado efeito positivo da arginina sobre as taxas de blastocisto não foi observado, da forma como havia sido em estudo anterior conduzido em camundongos (Kim et al., 2004). Todavia, no estudo citado o efeito foi observado mediante a microinjeção de meio de cultivo contendo arginina no citoplasma dos zigotos, sendo o efeito benéfico observado somente em baixa dose de arginina, pois altas doses tiveram efeito inverso, causando degeneração embrionária.

Por outro lado, a adição de arginina em baixa dose também não prejudicou o desenvolvimento embrionário, diferente de estudos anteriores empregando doadores sintéticos de NO^- , em que foi relatada inibição do desenvolvimento de embriões murinos, especialmente no estágio de mórula para blastocisto (Biswas et al., 1998; Sengoku et al., 2001). A redução significativa da taxa de blastocisto só foi observada na presença de alta dose de arginina (50mM), corroborando estudos anteriores que empregaram doadores sintéticos de NO^- no cultivo de embriões murinos (Barroso et al., 1998; Chen et al., 2001; Orsi, 2006).

Especulamos que a arginina adicionada isoladamente ao meio de cultivo, ao regular o metabolismo celular via NO^- , seja capaz de melhorar a cinética e

qualidade embrionária, mas não de aumentar a taxa de blastocisto. E que os efeitos benéficos observados sejam mediados de forma dose dependente, existindo um limiar a partir do qual a arginina seria potencialmente citotóxica. Visto que, a produção excessiva de NO^- na célula pode resultar na sua conversão em peroxinitrito, um potente agente oxidativo, e também inibidor persistente do complexo I da cadeia respiratória, diminuindo irreversivelmente a produção de ATP na célula (Riobo et al., 2001), caracterizando um dos prováveis mecanismos que podem levar ao comprometimento do desenvolvimento embrionário.

5.2 O EFEITO ESTÁGIO DEPENDENTE DO SISTEMA ARGININA/ NO^- SOBRE O DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS: SEU PAPEL NO PROCESSO DE ECLOSÃO DO BLASTOCISTO

Frente ao comportamento dual do sistema arginina/ NO^- , um controle preciso da captação/consumo de arginina deve ser feito pela célula (Van Winkle, 2001) Sabe-se que de acordo com o estágio de desenvolvimento os embriões tem requerimento preferencial de nutrientes (Thompson, 2000), inclusive de aminoácidos (Biggers and Summers, 2008). Particularmente o acúmulo de arginina dentro da célula é dependente de vários fatores, um deles é a expressão das proteínas CAT (Van Winkle, 1990). Assim como a conversão da arginina em NO^- é dependente da expressão das enzimas NOS (Tesfaye et al., 2006).

Em ambos os casos a expressão embrionária varia conforme o estágio de desenvolvimento, isso pode explicar porque a arginina adicionada somente do 5º ao 8º dia de cultivo (experimento 3) foi capaz de aumentar a eclosão, e não foi capaz quando adicionada durante todo o cultivo *in vitro* (experimento 2). Juntos, os resultados dos experimentos 2 e 3 demonstraram que o sistema arginina/NO⁻ é finamente regulado de acordo com o estágio do desenvolvimento embrionário. E particularmente o experimento 3 evidencia que o período compreendido entre os estágios de mórula e blastocisto é o período crítico em que o sistema arginina/NO⁻ atua sobre o metabolismo dos embriões bovinos.

Mostramos que o sistema arginina/NO⁻, atuante em baixas concentrações, e em um período específico de desenvolvimento melhorou a eclosão em blastocistos bovinos. Uma explicação para isso, é que o NO⁻ regula a produção de prostaglandinas, que por sua vez, demonstrou aumentar a eclosão em blastocistos murinos (Huang et al., 2004). O NO⁻ estimula as enzimas ciclooxigenase (COX) a produzir prostaglandinas através de um mecanismo ainda não esclarecido, existindo apenas especulações quanto sua ação através da produção de EROS, e S-nitrosilação aumentando a atividade catalítica das COX (Cuzzocrea and Salvemini, 2007).

Especulamos que a adição de arginina do estágio de mórula a blastocisto, tenha agido via NO⁻, estimulando a produção de prostaglandinas e a eclosão em blastocistos bovinos. O que corrobora estudo anterior (Saint-Dizier et al., 2011), que mostrou o aumento da expressão de COX e produção de prostaglandinas, justamente nos estágios de mórula e blastocisto em embriões bovinos produzidos *in vitro*, o que esteve relacionado tanto com a qualidade embrionária quanto com e

eclosão. Juntos esses achados evidenciam a plasticidade do NO^- , para interagir com outras moléculas de sinalização e regular o desenvolvimento embrionário.

O processo de eclosão é um aspecto essencial do desenvolvimento do embrião pré-implantacional. Em humanos, por exemplo, a ausência de eclosão tem sido relacionada à falha de implantação (Petersen et al., 2005). A eclosão é regulada por uma variedade de fatores de crescimento, citocinas e proteases, secretadas tanto pelo embrião quanto pelo endométrio, e que agem sobre a zona pelúcida até a sua dissolução (Seshagiri et al., 2009).

Também ocorre por causa da pressão hidroestática, exercida sobre a zona pelúcida, em função do acúmulo de líquido na blastocela, que é mediado por aquaporinas de membrana e dirigido pelo gradiente de íons e solutos (Barcroft et al., 2003). Como a captação de arginina, é mediada pelo co-transporte dependente de sódio, é possível que mudanças osmóticas favorecendo o acúmulo de líquido, e expansão da blastocela, sejam outro provável mecanismo pelo qual o sistema arginina/ NO^- poderia estar regulando a eclosão em blastocistos bovinos.

Tem sido sugerido que a captação de arginina além de atuar em mecanismo de osmoregulação, também previne a rejeição do embrião. Pois diminui a quantidade de triptofano disponível no ambiente uterino, que é um substrato para a proliferação de células-T, umas das células promotoras da resposta imune (Van Winkle, 2001). O papel do sistema arginina/ NO^- nos processos de implantação tem sido extensivamente estudado nos modelos murino e humano, mas os achados são controversos.

Se por um lado, concentrações aumentadas de NO^- no ambiente intra-uterino foram relacionadas à perda embrionária (Orsi, 2006), inibição do processo

de implantação (Barroso et al., 1998), e infertilidade em humanos (Luo et al., 2011). Por outro lado, a inibição do sistema arginina/ NO^- levou ao retardo do desenvolvimento embrionário e falha da implantação em camundongos (Biswas et al., 1998). Sendo que descobertas recentes mostraram que a arginina pode regular a atividade de mTOR (complexo alvo de rapamicina em mamíferos) conhecido por ativar uma cascata de sinalização que promove as mudanças necessárias para a implantação em camundongos (Gonzalez et al., 2012).

Além de controverso, pouco se sabe sobre o papel do sistema arginina/ NO^- em bovinos, cujos processos de implantação e placentação são diferentes dos que ocorrem nas espécies citadas (Bazer et al., 2010). Diante desse contexto, resolvemos avaliar a expressão gênica embrionária, com o objetivo de inferir possíveis funções do sistema arginina/ NO^- sobre o potencial de diferenciação e a competência para implantação dos blastocistos bovinos.

5.3 A REGULAÇÃO DOSE E TEMPO DEPENDENTE DO SISTEMA ARGININA/ NO^- CONTRIBUEM PARA A MELHORIA DA QUALIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*: SUA IMPLICAÇÃO NO PROCESSO DE IMPLANTAÇÃO

Neste trabalho foram avaliadas a expressão dos genes OCT-4 e INT-t, ambos relacionados a qualidade embrionária (Niemann and Wrenzycki, 2000). O OCT-4 (POU5F1) é um membro da família de fatores de transcrição POU, é

altamente expresso em células pluripotentes e gradualmente silenciado quando ocorre diferenciação (Shi and Jin, 2010). A expressão reduzida de OCT-4, frequentemente observada em embriões clones em comparação a embriões FIV, é associada à falha de reprogramação nuclear, e do desenvolvimento e função do trofoblasto (Broniowska and Hogg, 2010). Neste estudo, a expressão de OCT-4 foi similar na presença de arginina e glutamina, e também de L-NAME, mostrando que a inibição de NO⁻ não alterou o estado de pluripotência celular.

O INT-t, por sua vez, é um bem relatado sinal de reconhecimento da gravidez em ruminantes, sua função *in vivo* envolve o reconhecimento materno e fetal, e a manutenção da atividade do corpo lúteo (Bazer et al., 2009). É expresso pelo trofoblasto a partir do estágio de blastocisto quando ocorre a primeira diferenciação celular, que origina o embrioblasto e o trofoblasto (Degrelle et al., 2005), e tem sido usado como um indicador da qualidade embrionária em embriões produzidos *in vitro* (Yao et al., 2009). Neste estudo, mostramos que blastocistos bovinos cultivados na presença de arginina ou glutamina exibiram expressão similar de INT-t no 8^o dia de desenvolvimento.

Mas na presença de L-NAME, mesmo com a adição simultânea de arginina, foi observada redução da expressão de INT-t. Isso sugere que o NO⁻, pode exercer função reguladora nos mecanismos de implantação em embriões-pré-implantacionais bovinos. E que a inibição de sua produção pode alterar mais significativamente a expressão nas células trofoblásticas, corroborando o achado de Tesfaye et al. (2006), que relataram massiva presença de enzimas NOS no trofoblasto de blastocistos bovinos, em comparação a MCI.

Estudos com ovinos tem demonstrado mecanismos de ação da arginina, principalmente no período peri-implantacional de desenvolvimento (Bazer et al., 2010). A arginina é capaz de regular cascatas de sinalização como a promovida pelo mTOR, e AKT1, que estimulam a proliferação celular e migração das células do trofoectoderma (Kim et al., 2011b). E pode ainda ser convertida em NO^- , que atua como sinalizador celular, regulador da atividade mitocondrial (Manser et al., 2006), e precursor da síntese de poliaminas, importantes substratos para a proliferação celular (Igarashi and Kashiwagi, 2000). Foi visto que a arginina através da ativação de mTOR estimulou a produção de INT-t (Kim et al., 2011a). E o INT-t, por sua vez, estimulou a expressão de CAT, enzimas NOS, e Ornitina Descarboxilase (enzima que converte NO^- em poliaminas) tanto nas células endoteliais do endométrio, quanto no conceito ovino (Gao et al., 2009).

Propomos que, neste estudo, a inibição da produção de NO^- pelo L-NAME, resultou na desregulação das suas funções na célula. O que poderia resultar em menor proliferação celular, e logo, redução da expressão de INT-t mRNA (Figura 18). Especulamos que o NO^- atue realizando mudanças no perfil metabólico do embrião, e ativando cascatas de sinalização, como a promovida pelo mTOR durante o estágio de blastocisto em bovinos. Essas ações realizadas em paralelo resultariam na proliferação celular, o que teoricamente, tornaria o embrião mais apto a progredir além do estágio de blastocisto. Estudos em humanos relataram que a produção de NO^- foi positivamente relacionada com a progressão no desenvolvimento (Lipari et al., 2009), e com a qualidade embrionária (Battaglia et al., 2003). E que os embriões que produziam maior quantidade de NO^- , ao serem transferidos resultavam em maior ocorrência de gestação (Battaglia et al., 2003).

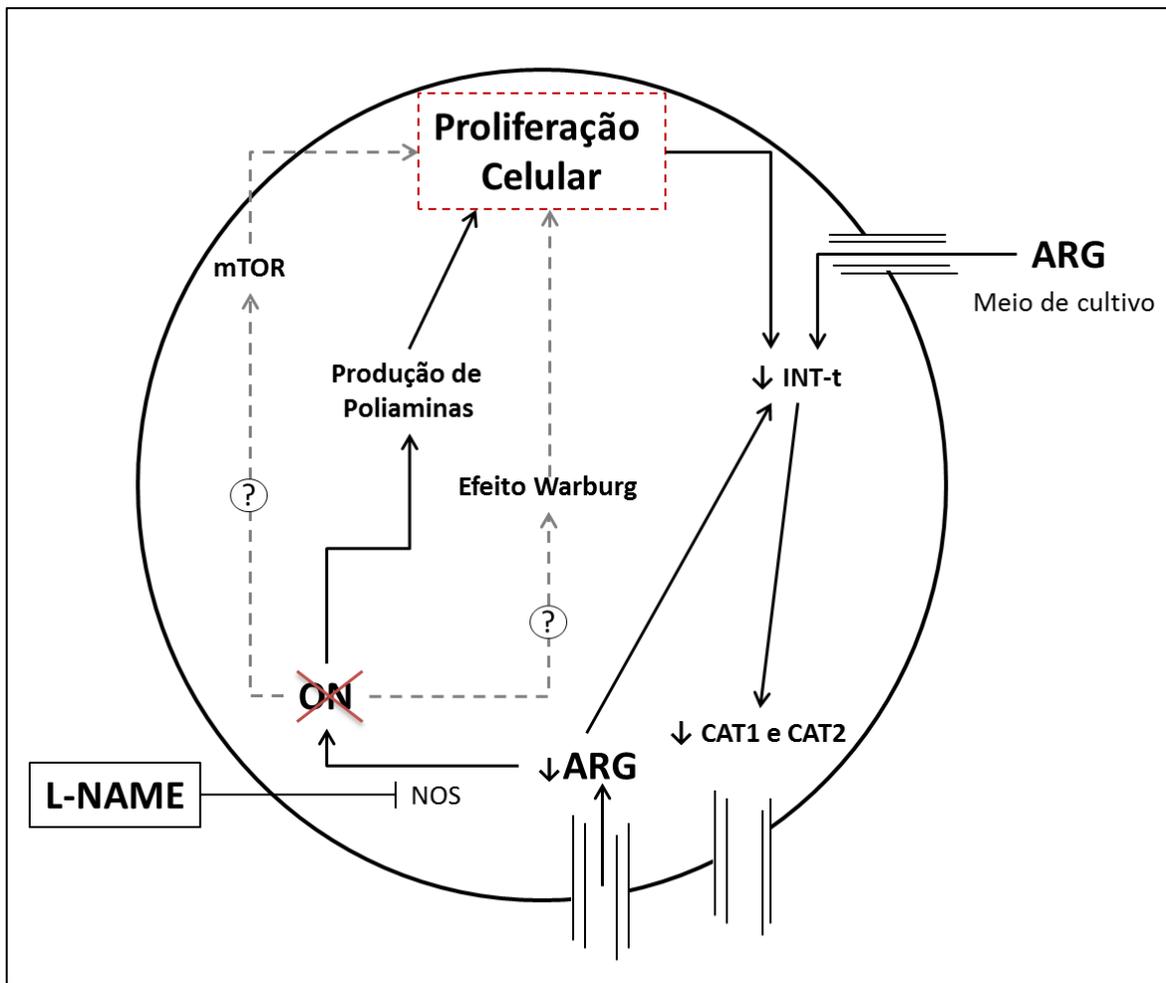


Figura 18: Esquema hipotético da inibição dos mecanismos ativados pela ARG/ NO^- nas células trofoblásticas de embriões bovinos produzidos *in vitro*. A produção de NO^- é inibida pelo L-NAME, inibidor competitivo e não seletivo das enzimas NOS. A diminuição de NO^- reduz a proliferação celular, pois ele atua como substrato para a produção de poliaminas, como um sinalizador celular (possivelmente ativando a via de mTOR), e como regulador da função mitocondrial e metabólica da célula (efeito Warburg). A menor proliferação das células trofoblásticas reduz a produção de INT-t, cuja sinalização estimula a expressão de CAT. A redução da captação de arginina, por sua vez, diminui a expressão de INT-t mRNA. NO^- (Óxido Nítrico). ARG (Arginina). NOS (Óxido Nítrico Sintase). mTOR (alvo de rapamicina em mamíferos). CAT (Transportadores de Aminoácidos Catiônicos). INT-t (interferon tau). L-NAME (L-Arginina-Metil-Éster).

Todavia, para validar a proposições acima citadas, seriam necessários outros estudos sobre a função do NO⁻ nos mecanismos de regulação metabólica e proliferação celular em blastocistos pré-implantacionais. Da mesma forma que estudos futuros empregando técnicas *in vivo* poderão elucidar a possível relação entre produção de NO⁻ e potencial de implantação do embrião.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluimos que o NO⁻ é essencial durante o desenvolvimento de embriões bovinos pré-implantacionais. Suas ações sobre o metabolismo embrionário são finamente reguladas de acordo com a dose e estágio de desenvolvimento em que há disponibilidade de substratos para sua síntese, como a L-arginina. O NO⁻ contribui para a melhoria da qualidade do embrião bovino produzido *in vitro*, e possivelmente da competência de desenvolvimento.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2000. Statistical software for microcomputers: SigmaPlot 2000 and SigmaStat2. *British Journal of Mathematical and Statistical Psychology* 53, 335-337.

ALIKANI, M., COHEN, J., TOMKIN, G., GARRISI, G.J., MACK, C., SCOTT, R.T., 1999. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril* 71, 836-842.

ALVAREZ, M.N., PELUFFO, G., PIACENZA, L., RADI, R., 2011. Intrapagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. *J Biol Chem* 286, 6627-6640.

AMORES-SANCHEZ, M.I., MEDINA, M.A., 1999. Glutamine, as a precursor of glutathione, and oxidative stress. *Mol Genet Metab* 67, 100-105.

AMSTERDAM, A., SASSON, R., 2002. The anti-inflammatory action of glucocorticoids is mediated by cell type specific regulation of apoptosis. *Mol Cell Endocrinol* 189, 1-9.

BADR, H., BONGIONI, G., ABDOON, A.S., KANDIL, O., PUGLISI, R., 2007. Gene expression in the in vitro-produced preimplantation bovine embryos. *Zygote* 15, 355-367.

BARCROFT, L.C., OFFENBERG, H., THOMSEN, P., WATSON, A.J., 2003. Aquaporin proteins in murine trophectoderm mediate transepithelial water movements during cavitation. *Dev Biol* 256, 342-354.

BARROSO, R.P., OSUAMKPE, C., NAGAMANI, M., YALLAMPALLI, C., 1998. Nitric oxide inhibits development of embryos and implantation in mice. *Mol Hum Reprod* 4, 503-507.

BATTAGLIA, C., CIOTTI, P., NOTARANGELO, L., FRATTO, R., FACCHINETTI, F., DE ALOYSIO, D., 2003. Embryonic production of nitric oxide and its role in implantation: a pilot study. *J Assist Reprod Genet* 20, 449-454.

BAZER, F.W., SPENCER, T.E., JOHNSON, G.A., 2009. Interferons and uterine receptivity. *Semin Reprod Med* 27, 90-102.

BAZER, F.W., WU, G., SPENCER, T.E., JOHNSON, G.A., BURGHARDT, R.C., BAYLESS, K., 2010. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. *Mol Hum Reprod* 16, 135-152.

BIGGERS, J.D., SUMMERS, M.C., 2008. Choosing a culture medium: making informed choices. *Fertil Steril* 90, 473-483.

BISWAS, S., KABIR, S.N., PAL, A.K., 1998. The role of nitric oxide in the process of implantation in rats. *J Reprod Fertil* 114, 157-161.

BLOCK, J., 2007. Use of insulin-like growth factor-1 to improve post-transfer survival of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology* 68 Suppl 1, S49-55.

BONI, R., TOSTI, E., ROVIELLO, S., DALE, B., 1999. Intercellular communication in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. *Biol Reprod* 61, 1050-1055.

BOUCHER, J.L., MOALI, C., TENU, J.P., 1999. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci* 55, 1015-1028.

BRONIOWSKA, K.A., HOGG, N., 2010. Differential mechanisms of inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by S-nitrosothiols and NO in cellular and cell-free conditions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299, H1212-1219.

BRUCKDORFER, R., 2005. The basics about nitric oxide. *Mol Aspects Med* 26, 3-31.

CHEN, H.W., JIANG, W.S., TZENG, C.R., 2001. Nitric oxide as a regulator in preimplantation embryo development and apoptosis. *Fertil Steril* 75, 1163-1171.

CHRISTIE, A., BUTLER, M., 1994. Glutamine-based dipeptides are utilized in mammalian cell culture by extracellular hydrolysis catalyzed by a specific peptidase. *J Biotechnol* 37, 277-290.

COOKE, J.P., 2003. NO and angiogenesis. *Atheroscler Suppl* 4, 53-60.

CORCORAN, D., RIZOS, D., FAIR, T., EVANS, A.C., LONERGAN, P., 2007. Temporal expression of transcripts related to embryo quality in bovine embryos cultured from the two-cell to blastocyst stage in vitro or in vivo. *Mol Reprod Dev* 74, 972-977.

CUZZOCREA, S., SALVEMINI, D., 2007. Molecular mechanisms involved in the reciprocal regulation of cyclooxygenase and nitric oxide synthase enzymes. *Kidney Int* 71, 290-297.

DEGRELLE, S.A., CAMPION, E., CABAU, C., PIUMI, F., REINAUD, P., RICHARD, C., RENARD, J.P., HUE, I., 2005. Molecular evidence for a critical period in mural trophoblast development in bovine blastocysts. *Dev Biol* 288, 448-460.

DUX, E., NOBLE, L., CHAN, P.H., 1991. Glutamine stimulates growth in rat cerebral endothelial cell culture. *J Neurosci Res* 29, 355-361.

ELFERING, S.L., SARKELA, T.M., GIULIVI, C., 2002. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 277, 38079-38086.

FALETTI, A., PEREZ MARTINEZ, S., PEROTTI, C., DE GIMENO, M.A., 1999. Activity of ovarian nitric oxide synthase (NOs) during ovulatory process in the rat: relationship with prostaglandins (PGs) production. *Nitric Oxide* 3, 340-347.

FEUGANG, J.M., DE ROOVER, R., MOENS, A., LEONARD, S., DESSY, F., DONNAY, I., 2004. Addition of beta-mercaptoethanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. *Theriogenology* 61, 71-90.

FLORA-FILHO, R., ZILBERSTEIN, B., 2000. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções. Rev Ass Med Brasil* 46, 265-271.

GAO, H., WU, G., SPENCER, T.E., JOHNSON, G.A., BAZER, F.W., 2009. Select nutrients in the ovine uterine lumen. III. Cationic amino acid transporters in the ovine uterus and peri-implantation conceptuses. *Biol Reprod* 80, 602-609.

GARDNER, D.K., LANE, M., 1997. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update* 3, 367-382.

GARDNER, D.K., LANE, M., CALDERON, I., LEETON, J., 1996. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril* 65, 349-353.

GARTHWAITE, J., CHARLES, S.L., CHESS-WILLIAMS, R., 1988. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336, 385-388.

GIANAROLI, L., MAGLI, M.C., FERRARETTI, A.P., FORTINI, D., GRIECO, N., 2003. Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertil Steril* 80, 341-349.

GONZALEZ, I.M., MARTIN, P.M., BURDSAL, C., SLOAN, J.L., MAGER, S., HARRIS, T., SUTHERLAND, A.E., 2012. Leucine and arginine regulate trophoblast motility through mTOR-dependent and independent pathways in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 361, 286-300.

GOUGE, R.C., MARSHBURN, P., GORDON, B.E., NUNLEY, W., HUET-HUDSON, Y.M., 1998. Nitric oxide as a regulator of embryonic development. *Biol Reprod* 58, 875-879.

HARVEY, A.J., KIND, K.L., PANTALEON, M., ARMSTRONG, D.T., THOMPSON, J.G., 2004. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. *Biol Reprod* 71, 1108-1119.

HARVEY, A.J., NAVARRETE SANTOS, A., KIRSTEIN, M., KIND, K.L., FISCHER, B., THOMPSON, J.G., 2007. Differential expression of oxygen-regulated genes in bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev* 74, 290-299.

HESS, D.T., STAMLER, J.S., 2012. Regulation by S-nitrosylation of protein post-translational modification. *J Biol Chem* 287, 4411-4418.

HIBBS, J.B., JR., TAINTOR, R.R., VAVRIN, Z., RACHLIN, E.M., 1988. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 157, 87-94.

HOLM, P., BOOTH, P.J., SCHMIDT, M.H., GREVE, T., CALLESEN, H., 1999. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 52, 683-700.

HUANG, J.C., WUN, W.S., GOLDSBY, J.S., MATIJEVIC-ALEKSIC, N., WU, K.K., 2004. Cyclooxygenase-2-derived endogenous prostacyclin enhances mouse embryo hatching. *Hum Reprod* 19, 2900-2906.

IGARASHI, K., KASHIWAGI, K., 2000. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* 271, 559-564.

IGNARRO, L.J., BUGA, G.M., WOOD, K.S., BYRNS, R.E., CHAUDHURI, G., 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 9265-9269.

JABLONKA-SHARIFF, A., OLSON, L.M., 1998. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. *Endocrinology* 139, 2944-2954.

KIM, B.H., KIM, C.H., JUNG, K.Y., JEON, B.H., JU, E.J., CHOO, Y.K., 2004. Involvement of nitric oxide during in vitro fertilization and early embryonic development in mice. *Arch Pharm Res* 27, 86-93.

KIM, J., BURGHARDT, R.C., WU, G., JOHNSON, G.A., SPENCER, T.E., BAZER, F.W., 2011a. Select nutrients in the ovine uterine lumen. IX. Differential effects of arginine, leucine, glutamine, and glucose on interferon tau, ornithine decarboxylase, and nitric oxide synthase in the ovine conceptus. *Biol Reprod* 84, 1139-1147.

KIM, J.Y., BURGHARDT, R.C., WU, G., JOHNSON, G.A., SPENCER, T.E., BAZER, F.W., 2011b. Select nutrients in the ovine uterine lumen. VII. Effects of arginine, leucine, glutamine, and glucose on trophectoderm cell signaling, proliferation, and migration. *Biol Reprod* 84, 62-69.

KIMURA, K., SPATE, L.D., GREEN, M.P., MURPHY, C.N., SEIDEL, G.E., JR., ROBERTS, R.M., 2004. Sexual dimorphism in interferon-tau production by in vivo-derived bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 67, 193-199.

KNOBIL, E., NEILL, J.D., 2006. Knobil And Neill's Physiology Of Reproduction, In: Neill, J.D. (Ed.), Elsevier Academic Press, St. Louis, USA, p. 337.

KOOLMAN, J., ROHM, K.H., 2005a. Bioquímica, texto e atlas, Editora Artmed, p. 138.

KOOLMAN, J., ROHM, K.H., 2005b. Bioquímica, texto e atlas, Editora Artmed, p. 182.

KRISHER, R.L., PRATHER, R.S., 2012. A role for the Warburg Effect in preimplantation embryo development: Metabolic modification to support rapid cell proliferation. *Mol Reprod Dev*.

LAPOINTE, J., ROY, M., ST-PIERRE, I., KIMMINS, S., GAUVREAU, D., MACLAREN, L.A., BILODEAU, J.F., 2006. Hormonal and spatial regulation of nitric oxide synthases (NOS) (neuronal NOS, inducible NOS, and endothelial NOS) in the oviducts. *Endocrinology* 147, 5600-5610.

LESSLEY, B.A., GARNER, D.L., 1983. Isolation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation in Percoll®. *Gamete Research* 7, 49-61.

LIM, J.M., HANSEL, W., 1998. Improved development of in vitro-derived bovine embryos by use of a nitric oxide scavenger in a cumulus-granulosa cell coculture system. *Mol Reprod Dev* 50, 45-53.

LIPARI, C.W., GARCIA, J.E., ZHAO, Y., THRIFT, K., VAIDYA, D., RODRIGUEZ, A., 2009. Nitric oxide metabolite production in the human preimplantation embryo and successful blastocyst formation. *Fertil Steril* 91, 1316-1318.

LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods* 25, 402-408.

LONERGAN, P., FAIR, T., CORCORAN, D., EVANS, A.C., 2006. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* 65, 137-152.

LONERGAN, P., RIZOS, D., GUTIERREZ-ADAN, A., MOREIRA, P.M., PINTADO, B., DE LA FUENTE, J., BOLAND, M.P., 2003. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. *Biol Reprod* 69, 1424-1431.

LUO, Q., CHEN, X.J., DING, G.L., DONG, M.Y., HUANG, H.F., 2011. Downregulative effects of nitric oxide on oocyte fertilization and embryo

development: possible roles of nitric oxide in the pathogenesis of endometriosis-associated infertility. *Cell Physiol Biochem* 26, 1023-1028.

MANSER, R.C., HOUGHTON, F.D., 2006. Ca²⁺-linked upregulation and mitochondrial production of nitric oxide in the mouse preimplantation embryo. *J Cell Sci* 119, 2048-2055.

MANSER, R.C., LEESE, H.J., HOUGHTON, F.D., 2004. Effect of inhibiting nitric oxide production on mouse preimplantation embryo development and metabolism. *Biol Reprod* 71, 528-533.

MEIRELLES, F.V., CAETANO, A.R., WATANABE, Y.F., RIPAMONTE, P., CARAMBULA, S.F., MERIGHE, G.K., GARCIA, S.M., 2004. Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 82-83, 13-20.

MONCADA, S., PALMER, R.M., HIGGS, E.A., 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43, 109-142.

MUNZEL, T., FEIL, R., MULSCH, A., LOHMANN, S.M., HOFMANN, F., WALTER, U., 2003. Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase [corrected]. *Circulation* 108, 2172-2183.

MURAD, F., 1999. Cellular signaling with nitric oxide and cyclic GMP. *Braz J Med Biol Res* 32, 1317-1327.

NEIRA, J.A., TAINTURIER, D., L'HARIDON, R.M., MARTAL, J., 2007. Comparative IFN-tau secretion after hatching by bovine blastocysts derived ex vivo and completely produced in vitro. *Reprod Domest Anim* 42, 68-75.

NIEMANN, H., WRENZYCKI, C., 2000. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology* 53, 21-34.

NIWA, H., TOYOOKA, Y., SHIMOSATO, D., STRUMPF, D., TAKAHASHI, K., YAGI, R., ROSSANT, J., 2005. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* 123, 917-929.

O'FLAHERTY, C., RODRIGUEZ, P., SRIVASTAVA, S., 2004. L-arginine promotes capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 1674, 215-221.

ORSI, N.M., 2006. Embryotoxicity of the nitric oxide donor sodium nitroprusside in preimplantation bovine embryos in vitro. *Anim Reprod Sci* 91, 225-236.

PALMER, R.M., FERRIGE, A.G., MONCADA, S., 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526.

PARIKH, F.R., NADKARNI, S.G., NAIK, N.J., NAIK, D.J., UTTAMCHANDANI, S.A., 2006. Cumulus coculture and cumulus-aided embryo transfer increases pregnancy rates in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 86, 839-847.

PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J., WINER, M.A., FIRST, N.L., 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 38, 1171-1180.

PETERSEN, C.G., MAURI, A.L., BARUFFI, R.L., OLIVEIRA, J.B., MASSARO, F.C., ELDER, K., FRANCO, J.G., JR., 2005. Implantation failures: success of assisted hatching with quarter-laser zona thinning. *Reprod Biomed Online* 10, 224-229.

PONTES, J.H., NONATO-JUNIOR, I., SANCHES, B.V., ERENO-JUNIOR, J.C., UVO, S., BARREIROS, T.R., OLIVEIRA, J.A., HASLER, J.F., SENEDA, M.M., 2009. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology* 71, 690-697.

REDEL, B.K., BROWN, A.N., SPATE, L.D., WHITWORTH, K.M., GREEN, J.A., PRATHER, R.S., 2012. Glycolysis in preimplantation development is partially controlled by the Warburg Effect. *Mol Reprod Dev* 79, 262-271.

REES, D.D., PALMER, R.M., SCHULZ, R., HODSON, H.F., MONCADA, S., 1990. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 101, 746-752.

RICART-JANE, D., LLOBERA, M., LOPEZ-TEJERO, M.D., 2002. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. *Nitric Oxide* 6, 178-185.

RIOBO, N.A., CLEMENTI, E., MELANI, M., BOVERIS, A., CADENAS, E., MONCADA, S., PODEROSO, J.J., 2001. Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH:ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. *Biochem J* 359, 139-145.

RIZOS, D., CLEMENTE, M., BERMEJO-ALVAREZ, P., DE LA FUENTE, J., LONERGAN, P., GUTIERREZ-ADAN, A., 2008. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reprod Domest Anim* 43 Suppl 4, 44-50.

RIZOS, D., FAIR, T., PAPADOPOULOS, S., BOLAND, M.P., LONERGAN, P., 2002. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Mol Reprod Dev* 62, 320-327.

RIZOS, D., GUTIERREZ-ADAN, A., PEREZ-GARNELO, S., DE LA FUENTE, J., BOLAND, M.P., LONERGAN, P., 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod* 68, 236-243.

ROTH, E., 1998. L-arginine-nitric oxide metabolism. Glutamine: a new player in this metabolic game? *Clin Nutr* 17, 1-2.

SAINT-DIZIER, M., GUYADER-JOLY, C., CHARPIGNY, G., GRIMARD, B., HUMBLLOT, P., PONTER, A.A., 2011. Expression of enzymes involved in the synthesis of prostaglandin E2 in bovine in vitro-produced embryos. *Zygote* 19, 277-283.

SCATENA, R., BOTTONI, P., MARTORANA, G.E., GIARDINA, B., 2005. Nitric oxide donor drugs: an update on pathophysiology and therapeutic potential. *Expert Opin Investig Drugs* 14, 835-846.

SCHWARZ, K.R., PIRES, P.R., DE BEM, T.H., ADONA, P.R., LEAL, C.L., 2010. Consequences of nitric oxide synthase inhibition during bovine oocyte maturation on meiosis and embryo development. *Reprod Domest Anim* 45, 75-80.

SENGOKU, K., TAKUMA, N., HORIKAWA, M., TSUCHIYA, K., KOMORI, H., SHARIFA, D., TAMATE, K., ISHIKAWA, M., 2001. Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth in vitro. *Mol Reprod Dev* 58, 262-268.

SESHAGIRI, P.B., SEN ROY, S., SIREESHA, G., RAO, R.P., 2009. Cellular and molecular regulation of mammalian blastocyst hatching. *J Reprod Immunol* 83, 79-84.

SHI, G., JIN, Y., 2010. Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. *Stem Cell Res Ther* 1, 39.

SILVA, T.V.G., 2010. Uso da L-Arginina nos processos de capacitação espermática e fecundação In Vitro de oócitos bovinos, Núcleo De Ciências Agrárias E Desenvolvimento Rural, Universidade Federal do Pará, Belém.

STRINGFELLOW, D.A., SEIDEL, S.M., 1998. *Manual of the International Embryo Transfer Society*. International Embryo Transfer Society, IETS.

STUEHR, D.J., 2004. Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. *J Nutr* 134, 2748S-2751S; discussion 2765S-2767S.

TAO, Y., XIE, H., HONG, H., CHEN, X., JANG, J., XIA, G., 2005. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on porcine oocyte meiotic maturation. *Zygote* 13, 1-9.

TELFORD, N.A., WATSON, A.J., SCHULTZ, G.A., 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 26, 90-100.

TERVIT, H.R., WHITTINGHAM, D.G., ROWSON, L.E., 1972. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil* 30, 493-497.

TESFAYE, D., KADANGA, A., RINGS, F., BAUCH, K., JENNEN, D., NGANVONGPANIT, K., HOLKER, M., THOLEN, E., PONSUKSILI, S., WIMMERS, K., MONTAG, M., GILLES, M., KIRFEL, G., HERZOG, V., SCHELLANDER, K., 2006. The effect of nitric oxide inhibition and temporal expression patterns of the mRNA and protein products of nitric oxide synthase genes during in vitro development of bovine pre-implantation embryos. *Reprod Domest Anim* 41, 501-509.

THOMPSON, J.G., 2000. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. *Anim Reprod Sci* 60-61, 263-275.

TRANGUCH, S., STEUERWALD, N., HUET-HUDSON, Y.M., 2003. Nitric oxide synthase production and nitric oxide regulation of preimplantation embryo development. *Biol Reprod* 68, 1538-1544.

VAN DEN BERG, D.L., SNOEK, T., MULLIN, N.P., YATES, A., BEZSTAROSTI, K., DEMMERS, J., CHAMBERS, I., POOT, R.A., 2010. An Oct4-centered protein interaction network in embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 369-381.

VAN SOOM, A., MATEUSEN, B., LEROY, J., DE KRUIF, A., 2003. Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology? *Reprod Biomed Online* 7, 664-670.

VAN WINKLE, L.J., 2001. Amino acid transport regulation and early embryo development. *Biol Reprod* 64, 1-12.

VAN WINKLE, L.J., CAMPIONE, A.L., 1990. Functional changes in cation-preferring amino acid transport during development of preimplantation mouse conceptuses. *Biochim Biophys Acta* 1028, 165-173.

VANDER HEIDEN, M.G., CANTLEY, L.C., THOMPSON, C.B., 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029-1033.

VARAGO, F.C., MENDONÇA, L.F., LAGARES, M.A., 2008. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 32, 100-109.

VIANA, J.H.M., SIQUEIRA, L.G.B., PALHÃO, M.P., CAMARGO, L.S.A., 2010. Use of in vitro Fertilization Technique in the Last Decade and its Effect on Brazilian Embryo Industry and Animal Production. *Acta Scientiae Veterinariae* 38, 661-674.

VIGNEAULT, C., MCGRAW, S., SIRARD, M.A., 2009. Spatiotemporal expression of transcriptional regulators in concert with the maternal-to-embryonic transition during bovine in vitro embryogenesis. *Reproduction* 137, 13-21.

VIRAG, L., SZABO, E., GERGELY, P., SZABO, C., 2003. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett* 140-141, 113-124.

WANG, Z., 2012. Protein S-nitrosylation and cancer. *Cancer Lett* 320, 123-129.

WATSON, A.J., NATALE, D.R., BARCROFT, L.C., 2004. Molecular regulation of blastocyst formation. *Anim Reprod Sci* 82-83, 583-592.

WU, G., MORRIS, S.M., JR., 1998. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 336 (Pt 1), 1-17.

WU, G.Y., BROSANAN, J.T., 1992. Macrophages can convert citrulline into arginine. *Biochem J* 281 (Pt 1), 45-48.

YAO, N., WAN, P.C., HAO, Z.D., GAO, F.F., YANG, L., CUI, M.S., WU, Y., LIU, J.H., LIU, S., CHEN, H., ZENG, S.M., 2009. Expression of interferon-tau mRNA in bovine embryos derived from different procedures. *Reprod Domest Anim* 44, 132-139.

YILMAZ, O., CALKA, J., BUKOWSKI, R., ZALECKI, M., WASOWICZ, K., JAROSZEWSKI, J.J., MARKIEWICZ, W., BULBUL, A., UCAR, M., 2011. Nitric oxide in the bovine oviduct: Influence on contractile activity and nitric oxide synthase isoforms localization. *Theriogenology* 77, 1312-1327.