

DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS APÓS MATURAÇÃO *in vitro* DE OÓCITOS EM MEIO DE CULTIVO SUPLEMENTADO COM TAURINA OU GLICINA

Camila da Silva¹
Renata Sanches Calegari²
Alicio Martins Jr.³

RESUMO

Este estudo foi conduzido para investigar os efeitos da suplementação de taurina e glicina ao meio de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos, avaliando-se o subsequente desenvolvimento embrionário. Foliculos foram aspirados e oócitos com 3 a 4 camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo foram lavados em TCM 199, acrescido de bicarbonato de sódio, piruvato de sódio, penicilina, PVA e HEPES. Grupos de 15 a 25 oócitos foram maturados em TCM 199, suplementado com FSH, LH e SFB, na presença de taurina ou glicina, de acordo com o delineamento experimental. No experimento 1, a taurina foi adicionada nas concentrações de 0 mM, 1 mM, 10 mM e 100 mM. A glicina (experimento 2) foi utilizada nas concentrações de 0,67 mM, 10 mM e 100 mM. O meio TALP foi utilizado para o gradiente de Percoll e fertilização *in vitro*; após co-incubação por 20 horas, as células do *cumulus* foram removidas, e os prováveis zigotos transferidos para o meio SOF-m. Oócitos e embriões foram incubados a 39°C, sob atmosfera úmida a 5% de CO₂. Às 72 e 120 horas pós-inseminação (h pi), meio SOF-m foi adicionado às gotas. Os oócitos que clivaram e atingiram os estágios de mórula/blastocisto (Mo/Bl), blastocisto/blastocisto expandido (Bl/Bx) e blastocisto expandido/blastocisto eclodido (Bx/Be) foram registrados às 72, 144, 168 e 192 h pi, respectivamente. Os resultados foram analisados através de ANOVA e test-t de Bonferroni, com P<0,05. Não houve diferença significativa entre os grupos (experimento 1) para as porcentagens de fertilização, Mo/Bl, Bl/Bx e Bx/Be, com valores variando de 88,9 a 93,0%, 42,8 a 51,4%, 33,6 a 41,7% e 23,2 a 30,6%, respectivamente. No experimento 2, nenhuma diferença foi observada entre os grupos com relação à fertilização (90,3 a 97,0%). Entretanto, mais (P<0,05) Mo/Bl e Bl/Bx foram produzidos com glicina nas concentrações de 0,67 (49,3 e 33,3%, respectivamente) e 10 mM (54,5 e 44,7%) do que 100 mM (25,4 e 19,2%), enquanto que maiores porcentagens (P>0,05) de Bx/Be foram observados no grupo 10 mM (36,7%) do que no 100 mM (16,2%), com resultados similares quando comparado ao grupo controle (29,9%). Considerando-se as condições experimentais adotadas, concluiu-se que a adição de taurina ou glicina ao meio de MIV de oócitos bovinos não influenciou beneficemente o desenvolvimento embrionário, como evidenciado pelas porcentagens similares de produção de embriões.

Palavras-chave: oócitos, maturação *in vitro*, taurina, glicina, bovino.

BOVINE EMBRYO DEVELOPMENT AFTER *in vitro* OOCYTE MATURATION IN CULTURE MEDIUM SUPPLEMENTED WITH TAURINE OR GLYCINE**ABSTRACT**

This study was carried out to investigate the effect of taurine and glycine added to the *in vitro* maturation medium (IVM) of bovine oocytes, evidenced by the subsequent embryonic development. Follicles were aspirated and oocytes having at least 3 to 4 layers of cumulus cells and homogeneous cytoplasm were washed in TCM 199, plus sodium bicarbonate, sodium pyruvate, penicillin, PVA and HEPES. Groups of 15 to 25 oocytes were matured in TCM 199, supplemented with FSH, LH and

1

¹Graduando do Curso de Medicina Veterinária, FOA-UNESP, Araçatuba-SP, 16050-680, Brasil. E-mail: mila.ata@ig.com.br.

²Professora Voluntária do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, FOA-UNESP, Araçatuba-SP, 16050-680, Brasil. E-mail: renatacalegari@uol.com.br.

³Professor Adjunto do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, FOA-UNESP, Araçatuba-SP, 16050-680, Brasil. E-mail: amartins@fmva.unesp.br.

Entidade Financiadora: FAPESP, processo n°. 06/52609-5.

FCS, in presence of taurine or glycine, according to the experimental design. In experiment 1, taurine was added to the IVM medium at concentrations of 0 mM, 1 mM, 10 mM and 100 mM. Glycine (experiment 2) was used at concentrations of 0.67 mM, 10 mM and 100 mM. TALP medium was used for Percoll gradient and in vitro fertilization; after a 20 h co-incubation period, cumulus cells were removed, and the presumptive zygotes were transferred to m-SOF medium. The oocytes and embryos were cultured at 39°C in a humid atmosphere of 5% CO₂. At 72 and 120 h post-insemination (h pi), m-SOF medium was added to the drops. The oocytes that cleaved, and reached morula/blastocyst (M/B), blastocyst/expanded blastocyst (B/EB), expanded blastocyst/hatched blastocyst (EB/HB) stages were recorded at 72, 144, 168, and 192 h pi, respectively. Results were analyzed by ANOVA and Bonferroni *t*-test, with $P < 0.05$ taken as significant. There were no significant differences among treatment groups (experiment 1) for fertilization, M/B, B/EB and EB/HB rates, with values varying from 88.9 to 93.0%, 42.8 to 51.4%, 33.6 to 41.7% and 23.2 to 30.6%, respectively. In experiment 2, no difference was observed among groups with regard to the fertilization rates (90.3 to 97.0%). However, more ($P < 0.05$) M/B and B/EB were produced in presence of glycine at concentrations of 0.67 (49.3 e 33.3%, respectively) and 10 mM (54.5 e 44.7%) than 100 mM (25.4 e 19.2%), whereas higher percentages ($P < 0.05$) of EB/HB were observed for group 10 mM (36.7%) than for 100 mM (16.2%), with similar results as compared to control (29.9%). In conclusion, under these experimental conditions, the addition of either taurine or glycine to the IVM of bovine oocytes did not have beneficial influence on the embryonic development, as evidenced by the similar rates of embryo production.

Key words: oocytes, in vitro maturation, taurine, glycine, bovine.

DESARROLLO DE EMBRIONES BOVINOS DESPUÉS DE MADURACIÓN *in vitro* DE OOCITOS EN MEDIO DE CULTIVO COMPLEMENTADO CON TAURINA O GLICINA

RESUMEN

Este estudio fue realizado para investigar los efectos de suplementar taurina y glicina al medio de maduración *in vitro* (MIV) de oocitos bovinos, evaluando el resultado del desarrollo embrionario. Folículos fueron aspirados y ovocitos con 3 a 4 capas de células de *cumulus* y citoplasma homogéneo fueron lavados en TCM 199, junto con bicarbonato de sodio, piruvato de sodio, penicilina, PVA y HEPES. Grupos de 15 a 25 oocitos se maduraron en TCM 199, con FSH, LH y SFB, en presencia de la taurina o glicina, de acuerdo con la línea experimental. En el experimento 1, la taurina se añadió en concentraciones de 0 mM, 1 mM, 10 mM y 100 mM. La glicina (experimento 2) se utilizó en concentraciones de 0,67 mM, 10 mM y 100 mM. El medio TALP fue utilizado para el gradiente de Percoll y fertilización; después de 20 horas de coincubación, las células de *cumulus* se removieron y los presuntos cigotos fueron transferidos para el medio SOF-m. Oocitos y embriones fueron incubados a 39°C, en atmósfera húmeda a 5% de CO₂. A las 72 y 120 horas pos-inseminación (h pi) el medio SOF-m se añadieron las gotas. Oocitos que fertilizaron y alcanzaron los estadios de mórula/blastocito (Mo/Bl), blastocito/blastocito expandido (Bl/Bx) y blastocito expandido/blastocito eclodido (Bx/Be) se registraron a las 72, 144, 168 y 192 h pi, respectivamente. Resultados se analizaron a través de ANOVA y test-t de Bonferroni, con $P < 0,05$. No hubo diferencia significativa entre los grupos (experimento 1) para los porcentajes de fertilización, Mo/Bl, Bl/Bx y Bx/Be, con valores variando de 88,9 a 93,0%, 42,8 a 51,4%, 33,6 a 41,7% y 23,2 a 30,6% respectivamente. En el experimento 2, no se observó diferencia entre los grupos con relación a la fertilización (90,3 a 97,0%). Pero, más ($P < 0,05$) Mo/Bl y Bl/Bx se produjeron con glicina en concentraciones de 0,67 (49,3 y 33,3%, respectivamente) y 10 mM (54,5 y 44,7%) que la de 100 mM (25,4 y 19,2%), mientras mayores porcentajes ($P > 0,05$) de Bx/Be fueron observadas en el grupo 10 mM (36,7%) comparado con 100 mM (16,2%), con resultados similares al obtenido para el grupo controle (29,9%). Concluyendo, en las condiciones experimentales adoptadas, el adicionar de taurina o glicina al medio de MIV de oocitos bovinos no ejerció influencia en el desarrollo embrionario, como visto por las similares porcentajes de producción de embriones.

Palabras-claves: oocitos, maduración *in vitro*, taurina, glicina, bovino.

INTRODUÇÃO

Desde o primeiro sucesso com a aplicação da técnica de fertilização *in vitro* (FIV) em bovinos (BRACKETT et al., 1982), esforços têm sido direcionados ao aperfeiçoamento das diferentes etapas e meios envolvidos na produção *in vitro* (PIV) de embriões, principalmente em decorrência da adoção desta biotécnica para o melhoramento genético do rebanho bovino.

Apesar de todas as etapas envolvidas serem de singular importância para o sucesso final, o procedimento de cultivo do oócito é fundamental na PIV de embriões, pois deve simular um micro ambiente folicular e tubárico adequado para que a maturação citoplasmática e nuclear ocorra, tornando o oócito competente para ser fertilizado e, em decorrência, prosseguir o desenvolvimento para estágios embrionários mais avançados.

Desta forma, vários compostos têm sido adicionados ao meio de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos, em diferentes combinações e concentrações, entre eles, preparações purificadas ou recombinantes de FSH e/ou LH (MARTINS Jr. et al., 1998; MARTINS Jr. e BRACKETT, 2003), GnRH (FREITAS et al., 2002), 17 β -estradiol (BECKER et al., 2002), IGF-I (LACKEY et al., 2000; MARTINS Jr. et al., 2004), EGF (FREITAS et al., 2003), PVA (SIRARD e ALI, 2002), SFB (GLIEDT et al., 1996), BSA (WARD et al., 2002), catalase (MARTINS Jr. et al., 2003), alanina (MOORE e BONDIOLI, 1993) e cisteamina (MATOS et al., 1995).

Os aminoácidos, por sua vez, incrementam o desenvolvimento embrionário, o número de células embrionárias e a implantação pós-transferência (LEE et al., 1993), participam das funções celulares, promovendo o desenvolvimento e a diferenciação embrionária (BAVISTER, 1995), além de fornecerem um “pool” de precursores de proteínas, regularem o metabolismo do embrião e atuarem como controladores da osmolaridade e do pH intracelular (GARDNER e LANE, 1997).

A suplementação do meio de cultura de embriões com aminoácidos tem sido benéfica para o desenvolvimento embrionário *in vitro*, conforme relatos em coelhos (KANE e FOOTE, 1970), hamsters (BAVISTE e ARLOTTO, 1990), camundongos (GARDNER e LANE, 1993), ovinos (WALKER et al., 1996) e bovinos (KESKINTEPE e BRACKETT, 1996; KESKINTEPE et al., 1997).

O trato reprodutivo feminino contém elevadas concentrações de taurina, glutamina, glutamato e glicina (MILLER e SCHULTZ, 1987). A taurina, presente em oócitos e embriões (MEIZEL et al., 1980; SCHULTZ et al., 1981; MILLER e SCHULTZ, 1987; DUMOULIN et al., 1992; GUERIN e MÊNÉZO, 1995), pode exercer um efeito benéfico sobre o desenvolvimento embrionário até o estágio de pré-implantação, atuando na regulação da osmolaridade, modulação dos níveis de cálcio e estabilização de membrana (HUXTABLE, 1992, TIMBRELL et al., 1995).

Moore e Bondioli (1993) e Takahashi e Kanagawa (1998) demonstraram a importância da glicina sobre o desenvolvimento embrionário, após sua adição em co-cultura com células do oviduto e em meio quimicamente definido, respectivamente.

Contudo, nenhum relato foi encontrado na literatura a respeito da adição de taurina e/ou glicina ao meio de maturação de oócitos de bovinos *in vitro*. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da suplementação desses aminoácidos ao meio de MIV, mediante avaliação do subsequente desenvolvimento embrionário até os estágios de blastocisto expandido e blastocisto eclodido.

MATERIAL E MÉTODOS

COLHEITA DE OÓCITOS, SELEÇÃO E MATURAÇÃO *in vitro*

Os ovários de vacas abatidas em frigorífico foram transportados em garrafa térmica contendo solução fisiológica à temperatura de 31 a 33°C. Folículos de 2-7 mm de diâmetro foram aspirados utilizando-se agulha calibre 18 G e seringa de 10 mL; a seguir, o líquido folicular foi colocado em tubo de centrifuga de 15 mL e mantido a 39°C, por 15 minutos, para a sedimentação dos complexos *cumulus* oócitos (CCOs).

Após esse período, o sobrenadante foi descartado e os CCOs colocados em placa de Petri contendo TCM 199 (Sigma Co., EUA), 2,2 mg/mL de bicarbonato de sódio, 25 μ g/mL de piruvato de sódio, 50 μ g/mL de penicilina G, 1 mg/mL de PVA e 2,38 mg/mL de HEPES. Somente oócitos apresentando citoplasma homogêneo e pelo menos 3 a 4 camadas de células do *cumulus* foram selecionados.

Grupos de 15 a 25 oócitos foram transferidos para placas de Petri (60 x 15 mm) contendo gotas de meio de MIV (100 µL), constituído de TCM 199, suplementado com 10% de SFB (Nutricell, Brasil), 1 µg/mL de FSH (Pluset[®], Laboratórios Calier, Espanha) e 50 µg/mL de LH (Lutropin[®], Bioniche Inc., Canadá). A taurina ou a glicina foram adicionadas ao meio de MIV, de acordo com o delineamento experimental. A incubação foi realizada em estufa de cultura (Forma Scientific, Inc., EUA), a 39°C, sob atmosfera úmida, a 5% CO₂, por 24 horas.

PREPARAÇÃO DO SÊMEN E FERTILIZAÇÃO *in vitro*

A seleção espermática foi realizada pela técnica de gradiente de Percoll. Sendo assim, 1 mL de cada solução (45% e 90%) foi adicionado em tubo de centrifuga (15 mL), e mantida em estufa de CO₂, por 2 horas, para estabilização. Na seqüência, uma palheta de sêmen foi descongelada em água a 37°C por 30 segundos, e 450 µL da amostra foi cuidadosamente depositada sobre o gradiente de Percoll, sendo submetida à centrifugação a 700x g, por 30 minutos.

Após a remoção do sobrenadante, o sedimento foi diluído em 3 mL de meio TALP-plus e re-centrifugado (250x g/5 minutos); o “pellet” resultante foi re-suspendido em 50 µL de meio TALP-FIV e, posteriormente, utilizado para a inseminação. Então, grupos de 20 a 25 oócitos maturados foram transferidos para gotas de meio de FIV e co-incubados com aproximadamente 200.000 espermatozóides, sob as mesmas condições de cultivo adotadas para a MIV.

CULTIVO *in vitro* (CIV)

Decorridas 20 horas da inseminação, as células do *cumulus* foram parcialmente removidas e os prováveis zigotos transferidos para gotas de meio SOF-m, para as primeiras 48 horas de cultivo. Ao final dessa etapa, o número de oócitos fertilizados foi observado e somente zigotos com pelo menos 6 a 8 blastômeros foram mantidos para o restante do período de cultivo; para tanto, meio fresco, de mesma composição, foi adicionado às gotas, procedimento este repetido às 120 horas pós-inseminação (h pi).

A etapa de cultivo dos embriões também foi realizada sob as mesmas condições de atmosfera e temperatura descritas anteriormente. O desenvolvimento embrionário foi monitorado, e o número de oócitos fertilizados, bem como de embriões nos estágios de mórula/blastocisto (Mo/Bl), blastocisto/blastocisto expandido (Bl/Bx) e blastocisto expandido/blastocisto eclodido (Bx/Be), foram registrados às 72, 144, 168 e 192 h pi, respectivamente.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Dois experimentos foram realizados, independentemente, a partir de oócitos distribuídos aleatoriamente dentro dos respectivos grupos de tratamento, conforme metodologia descrita anteriormente.

Experimento 1: a taurina (Sigma Co., EUA; T-0625) adicionada ao meio de maturação, nas seguintes concentrações: 0, 1, 10 e 100 mM.

Experimento 2: a glicina (Sigma Co., EUA; G-8790) adicionada ao meio de maturação, nas seguintes concentrações: 0,67 (controle – TCM 199), 10 e 100 mM.

Como a glicina está presente na formulação do TCM 199 (0,67 mM), o grupo controle teve como base tal concentração; os demais grupos tiveram suas concentrações finais ajustadas em relação à glicina existente no TCM, ou seja, grupo 10 mM (0,67 + 9,33 mM) e grupo 100 mM (0,67 + 99,33 mM).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados de cinco replicatas, de cada experimento, foram agrupados e relatados como número e porcentagem de oócitos maturados que clivaram e atingiram os estágios de desenvolvimento embrionário indicados. A análise dos resultados foi feita pelo programa GraphPad InStat 3, sendo que ANOVA foi utilizada para verificar diferenças estatísticas e o teste *t* de Bonferroni para determinar diferenças entre os grupos de tratamento. Diferenças de $P < 0,05$ foram consideradas como significativas.

RESULTADOS

Os resultados obtidos no experimento 1, após a adição de taurina nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 mM, são mostrados na Tabela 1, não sendo observadas diferenças significativas ($P>0,05$) entre os grupos para a porcentagem de oócitos fertilizados, bem como de Mo/Bl, Bl/Bx e Bx/Be.

Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os grupos de tratamento com 0,67, 10 e 100 mM de glicina para os valores de porcentagens de fertilização, contudo, maiores valores percentuais ($P<0,05$) de Mo/Bl e Bl/Bx foram observados nos grupos 0,67 e 10 mM do que no 100 mM, às 144 e 168 h pi, com resultados similares entre 0,67 e 10 mM em todos os momentos. Diferença significativa ($P<0,05$) foi observada entre os grupos 10 e 100 mM para os estágios de Bx/Be, no entanto, a glicina na concentração de 0,67 mM não diferiu dos demais grupos, às 192 h pi (Tabela 2).

Nas figuras 1 e 2 podem ser observadas as características morfológicas dos embriões produzidos em meio contendo taurina ou glicina às 192 h pi, respectivamente.

TABELA 1. Efeitos da adição de diferentes concentrações de taurina na MIV sobre o desenvolvimento de oócitos bovinos fertilizados *in vitro*.

TABLE 1. Effects of addition of different concentrations of taurine to the IVM on the development of *in vitro* fertilized bovine oocytes.

Taurina <i>Taurine</i> (mM)	n	Oócitos <i>Oocytes</i>	Desenvolvimento embrionário - n (%) <i>Embryonic development - n (%)</i>		
		Fertilizados <i>Fertilized</i> 72 h	Mo/Bl <i>M/B</i> 144 h	Bl/Bx <i>B/EB</i> 168 h	Bx/Be <i>EB/HB</i> 192 h
0	144	128 (88,9)	74 (51,4)	60 (41,7)	44 (30,6)
1	149	136 (91,3)	68 (45,6)	50 (33,6)	39 (26,2)
10	142	132 (93,0)	68 (47,9)	52 (36,3)	41 (28,9)
100	138	126 (91,3)	59 (42,8)	48 (34,8)	32 (23,2)

Não houve diferença significativa ($P>0,05$)

No significant difference ($P>0.05$)

h = horas pós-inseminação

h = hours post-insemination

TABELA 2. Efeitos da adição de diferentes concentrações de glicina na MIV sobre o desenvolvimento de oócitos bovinos fertilizados *in vitro*.

Table 2. Effects of addition of different concentrations of glycine to the IVM on the development of *in vitro* fertilized bovine oocytes.

Oócitos <i>Oocytes</i>		Desenvolvimento embrionário - n (%) <i>Embryonic development - n (%)</i>			
Glicina <i>Glycine</i> (mM)	n	Fertilizados <i>Fertilized</i> 72 h	Mo/Bl <i>M/B</i> 144 h	Bl/Bx <i>B/EB</i> 168 h	Bx/Be <i>EB/HB</i> 192 h
0,67	144	130 (90,3)	71 (49,3) a	48 (33,3) a	43 (29,9) ab
10	132	128 (97,0)	72 (54,5) a	59 (44,7) a	44 (36,7) a
100	130	118 (90,8)	33 (25,4) b	25 (19,2) b	21 (16,2) b

^{a,b} Diferentes letras nas colunas mostram diferenças significativas ($P < 0,05$)

Different letters within columns denote significant differences ($P < 0.05$)

h = horas pós-inseminação

h = hours post-insemination

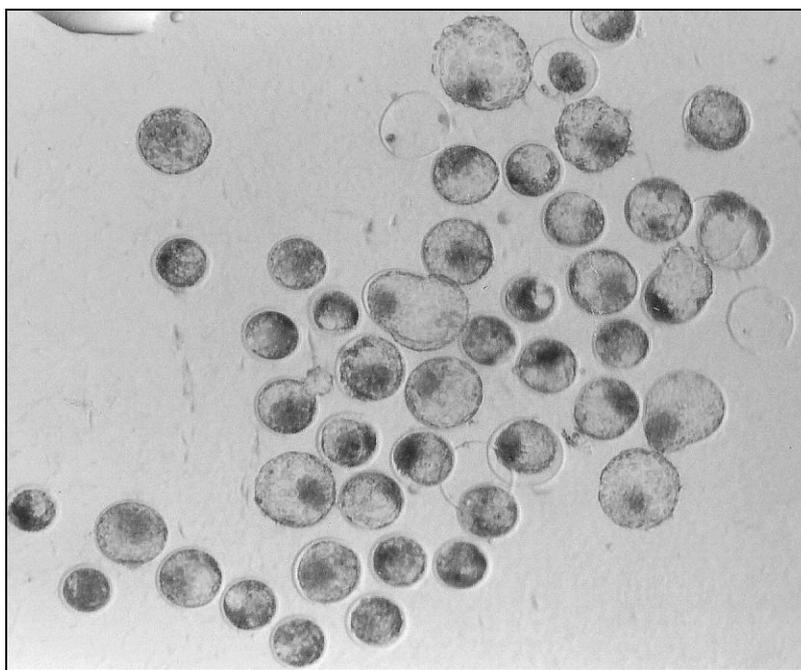


FIGURA 1. Blastocistos, blastocistos expandidos e blastocistos eclodidos 192 h pi – Grupo taurina (25x)

FIGURE 1. Blastocysts, expanded blastocysts and hatched blastocysts 192 h pi – Group taurine (25x)

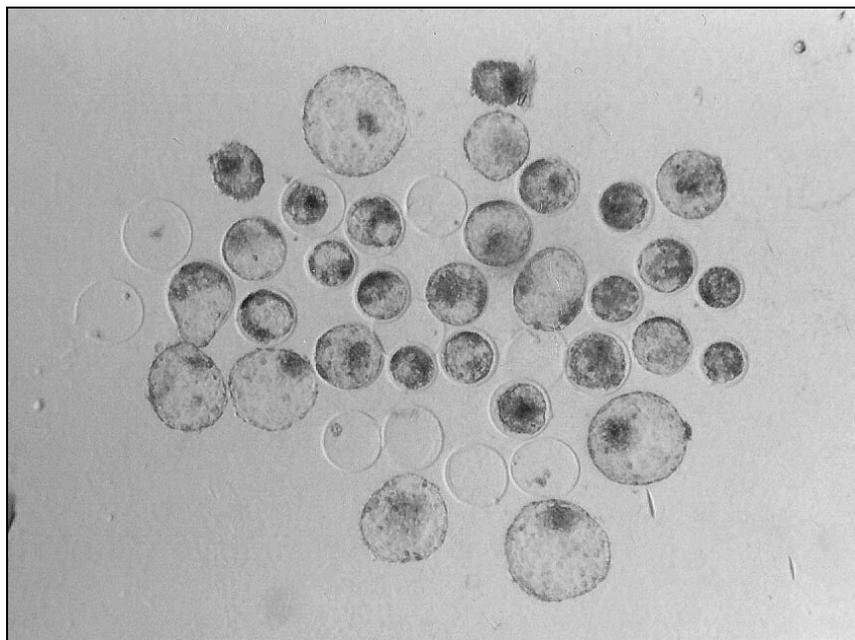


FIGURA 2. Blastocistos, blastocistos expandidos e blastocistos eclodidos 192 h pi – Grupo glicina (25x)

FIGURE 2. Blastocysts, expanded blastocysts and hatched blastocysts 192 h pi – Group glycine (25x)

DISCUSSÃO

Com base na literatura, este é o primeiro estudo visando investigar os efeitos da suplementação de taurina ou glicina no meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos. Porém, trabalhos têm sido realizados com a finalidade de verificar o papel de alguns aminoácidos adicionados no meio de cultivo *in vitro* de embriões bovinos (PARTRIDGE et al., 1996; TAKAHASHI e KANAGAWA, 1998; CAMARGO et al., 2002).

Hong e Lee (2007) demonstraram que o líquido folicular de suínos contém diversos aminoácidos, sendo que glicina, glutamato, alanina, glutamina e prolina foram encontrados em maiores concentrações. A suplementação individual de tais aminoácidos ao meio de MIV proporcionou aumento significativo na taxa de fertilização monospermica, formação do pró-núcleo masculino e desenvolvimento de embriões ao estágio de pré-implantação.

A adição de taurina (7 mM) no meio de cultura de embriões ovinos aumentou a clivagem e a produção de mórulas (RANGASAMY et al., 2007). Da mesma forma, Manjunatha et al. (2008) verificaram que o meio de cultivo de embriões de bubalinos, contendo taurina (1 mM), produziu um maior número de embriões transferíveis.

No presente experimento, a suplementação de taurina no meio de MIV não incrementou o desenvolvimento embrionário em nenhum dos estágios indicados. A ausência de efeito benéfico na produção de embriões sugere que tal aminoácido não exerceu influência direta sobre a maturação oocitária ou sua atuação foi alterada devido à composição complexa do meio TCM 199 e/ou pela presença de SFB, o qual contém hormônios, fatores de crescimento, vitaminas, peptídeos e uma variedade de moléculas definidas e não definidas (KESKINTEPE e BRACKETT, 1996).

Os componentes do meio de cultivo podem alterar ou mascarar os efeitos dos aminoácidos sobre o desenvolvimento embrionário, conforme relatado por Bavister (1995). A ação efetiva da taurina na produção de embriões de suínos e roedores foi observada por Liu e Foote (1995), após cultivo em meio definido livre de proteína, bem como por Camargo et al. (2002), para embriões de bovinos cultivados na ausência de SFB e/ou BSA.

Interessante que, a osmolaridade do meio de maturação apresentou valores médios de 294, 302, 304 e 379, respectivamente para os grupos 0, 1, 10 e 100 mM, ou seja, a adição de taurina na concentração de 100 mM aumentou significativamente a osmolaridade do meio de MIV, sem contudo afetar o desenvolvimento do oócito e dos embriões, provavelmente em decorrência da sua habilidade em regular a osmolaridade (LI et al., 1993).

Segundo Dumoulin et al. (1997), embriões cultivados em meio hiposmótico liberam taurina para o meio extracelular, por outro lado, em caso de meio hiperosmótico, o conteúdo intracelular do aminoácido permanece estável. Desta forma, como as condições satisfatórias de cultivo foram mantidas, possíveis efeitos aditivos e/ou sinérgicos da taurina tornaram-se imperceptíveis ou ausentes.

A taurina é o principal componente do “pool” de aminoácidos livres encontrado no fluido do trato reprodutivo feminino, estando, ainda, presente em oócitos e embriões de mamíferos (GUERIN e MÉNÉZO, 1995). Dentre suas funções biológicas, destacam-se a neutralização de aldeídos citotóxicos, produzidos durante a reação de peroxidação lipídica, a modulação de cálcio (BOATMAN, 1997) e a estabilização da membrana (HUXTABLE, 1992; TIMBRELL et al., 1995). Assim, é provável que desempenhe um papel importante como agente regulador de processos celulares sob condições naturais (*in vivo*) e artificiais (*in vitro*). Conforme, destacado por Li et al. (1993), seu efeito benéfico sobre o desenvolvimento embrionário pode ser também devido às suas propriedades antioxidante e/ou quelante.

A incorporação de glicina ao meio de MIV, em diferentes concentrações, não teve efeito aditivo e/ou sinérgico com outros elementos do meio de maturação e, conseqüentemente, não incrementou a produção *in vitro* de embriões bovinos.

Alguns pesquisadores têm demonstrado a importância da adição de glicina ao meio de cultura. Segundo Moore e Bondioli (1993), a combinação de glicina (2 mM) e alanina (1 mM), em co-cultura com células do oviduto, melhorou o desenvolvimento embrionário em comparação com o grupo controle. Da mesma forma, Takahashi e Kanagawa (1998) observaram que a suplementação de 10 mM de glicina em meio quimicamente definido, com aminoácidos essenciais e não essenciais, incrementou o desenvolvimento de zigotos de bovinos para o estágio de blastocisto. Contudo, no presente estudo, a adição de glicina ao meio de MIV não aumentou a subsequente produção de embriões, resultados estes similares aos encontrados por Xia et al. (1995), embora esses autores tenham adicionado glicina ao meio de cultivo de embriões suínos, na ausência de células do oviduto.

Com relação à osmolaridade do meio de MIV suplementado com glicina, os valores médios foram de 287 (0,67 mM), 298 (10 mM) e 381 mOsmol (100 mM), sendo que na concentração de 100 mM ocorreu uma elevação da pressão osmótica do meio sem, contudo, afetar o desenvolvimento dos oócitos e, posteriormente, dos embriões. Brinster (1965) e Wright e Bondioli (1981) observaram, respectivamente, que embriões de camundongos e de outras espécies podem se desenvolver em meio de cultivo hiperosmótico, sugerindo um efeito mínimo da osmolaridade no desenvolvimento embrionário (MOORE e BONDIOLI, 1993).

A glicina, produzida pelo epitélio do oviduto (MOORE e BONDIOLI, 1993), é um dos aminoácidos presente em maior concentração no trato reprodutivo da fêmea (ROUSSEAU e MENEZO, 1993). Além disso, mórulas e blastocistos bovinos cultivados *in vitro* produzem e secretam glicina, serina, alanina e glutamina no meio; por sua vez, a glicina preserva a estrutura tri-dimensional de moléculas complexas (BURG e PETERS, 1998).

Segundo Van Winkle et al. (1990) a glicina age como regulador da osmolaridade intracelular, sendo importante para proteger embriões de camundongos contra o estresse osmótico no oviduto, bem como para o controle do pH intracelular, ao atuar como transportadora de prótons (BAVISTER e McKIERNAN, 1991), fatores estes que podem ter contribuído para os resultados obtidos neste trabalho.

Este aminoácido é consumido por blastocistos de camundongo, podendo ser convertido para serina e alanina ou incorporado a proteínas e ácidos nucléicos para atuar como substrato energético e precursor (HOBBS e KAYE, 1985).

Devido ao fato de a glicina ser precursora de piruvato, e este compor o meio de MIV utilizado neste estudo, é provável que a ação glicogênica desse aminoácido tenha sido minimizada pela presença de piruvato e de glicose no meio de maturação; sabidamente a energia produzida pelo ciclo de Krebs é prontamente utilizada durante as etapas iniciais de desenvolvimento (MOORE e BONDIOLI, 1993) em comparação com a via glicolítica.

Assim, futuras investigações devem ser realizadas visando o estudo da incorporação de aminoácidos glicogênicos em variadas combinações e na ausência de substratos energéticos nas etapas de MIV e FIV de oócitos, além da CIV de embriões bovinos.

CONCLUSÕES

A suplementação do meio de cultivo *in vitro* de oócitos de bovinos com taurina ou glicina não influenciou benéficamente o desenvolvimento embrionário, como evidenciado pelas porcentagens similares de produção de embriões, considerando-se as condições experimentais adotadas no presente estudo.

REFERÊNCIAS

- ALI, A.; SIRARD, M.A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation. **Biol. Reprod.**, v.66, p.901-905, 2002.
- BAVISTER, B.D.; McKIERNAN, S.H. **Regulation of hamster embryo development *in vitro* by amino acids.** In: SERONO SYMPOSIUM ON PREIMPLANTATION EMBRYO DEVELOPMENT, 1991, Boston, MA.
- BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Hum. Reprod. Update**, v.1, p.91-148, 1995.
- BEKER, A.R.C.L.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M. Effect of 17 β -estradiol on the *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.58, p.1663-1673, 2002.
- BOATMAN, D.E. Responses of gametes to the oviductal environment. **Hum. Reprod.**, v.2, p.133-149, 1997.
- BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWICK, W.J; EVANS, J.F.; DRESSEL, M.A. Normal development following *in vitro* fertilization in cow. **Biol. Reprod.**, v.27, p.147-158, 1982.
- BRINSTER, R.L. Studies on the development of mouse embryos *in vitro* 1. The effect of osmolarity and hydrogen ion concentration. **J. Exp. Zool.**, v.158, p.49-58, 1965.
- BURG, M.B.; PETERS, E. Effects of glycine betaine and glycerophosphocholine on thermal stability of ribonuclease. **Am. J. Physiol.**, v.274, p.762-5, 1998.
- CAMARGO, L.S.A.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; VIANA, J.H.M.; ARAÚJO, M.C.C. Taurina no desenvolvimento de embriões bovinos fecundados *in vitro*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.54, p.396-404, 2002.
- DUMOULIN, J.C.M.; EVERS, J.L.H.; BRAS, M.; PIETERS, M.H.; GERAEDTS, J.P. Positive effect of taurine on preimplantation development of mouse embryos *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.**, v.94, p.373-380, 1992.
- DUMOULIN, J.C.M.; VAN WISSEN, L.C.; MENHEERE, P.P.; MICHIELS, A.H.; GERAEDTS, J.P.; EVERS, J.L. Taurine acts as an osmolyte in human and mouse oocytes and embryos. **Biol. Reprod.**, v.56, p.739-744, 1997.
- FREITAS, C.P.; MARTINS JÚNIOR, A.; STRINGHINI, G.; NOBRE, A.F.; BRACKETT, B.G.; SILVA, R.B. Addition of GnRH or FSH for bovine oocyte maturation enable comparable *in vitro* embryo. **Biol. Reprod.**, v.66, p.308, 2002.
- FREITAS, C.P.; MARTINS JÚNIOR, A.; BRACKETT, B.G.; TAKADA, L.; VENTUROLI, S.H. Aumento da produção de embriões bovinos após maturação de ovócitos com r-EGF. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.27, p.400-402, 2003.

GARDNER, D.K.; LANE, M. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. **Biol. Reprod.**, v.48, p.377-385, 1993.

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

GLIEDT, D.W.; ROSENKRANS, C.F.; RORIE, R.W.; MUNYON, A.L.; PIERSON, J.N.; MILLER, G.F.; RAKES, J.M. Effects of media, serum, oviductal cells, and hormones during maturation on bovine embryo development in vitro. **J. Dairy Sci.**, v.79, p.536-542, 1996.

GUERIN, P.; MÉNÉZO, Y. Hypotaurine and taurine in gamete and embryo environments: de novo synthesis via the cysteine sulfinic acid pathway in oviduct cells. **Zygote**, v.3, p.333-343, 1995.

HOBBS, J.G.; KAYE, P.L. Glycine transport in mouse eggs and preimplantation embryos. **J. Reprod. Fertil.**, v.74, p.77-86, 1985.

HONG, J.; LEE, E. Intrafollicular amino acid concentration and the effect of amino acids in a defined maturation medium on porcine oocyte maturation, fertilization, and preimplantation development. **Theriogenology**, v.68, p.728-735, 2007.

HUXTABLE, R.J. Physiological actions of taurine. **Physiol. Rev.**, v.72, p.101-163, 1992.

KANE, M.T.; FOOTE, R.H. Culture of two- and four-cell rabbit embryos to the expanding blastocyst stage in synthetic media. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.113, p.921-925, 1970.

KESKINTEPE, L.; BURNELEY, C.A.; BRACKETT, B.G. Production of viable bovine blastocysts in defined in vitro conditions. **Biol. Reprod.**, v.52, p.1410-1417, 1995.

KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B.G. *In vitro* development competence of *in vitro* matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. **Biol. Reprod.**, v.55, p.333-339, 1996.

LACKEY, B.R.; GRAY, S.L.L.; HENRICKS, D.M. Physiological basis for use of insulin-like growth factor in reproductive applications: a review. **Theriogenology**, v.53, p.1147-1156, 2000.

LI, J.; FOOTE, R.H.; SIMKIN, M. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine, or superoxide dismutase. **Biol. Reprod.**, v.48, p.33-37, 1993.

LEE, E.S.; FUKUI, Y. Synergistic effect of alanine on bovine embryos cultured in a chemically defined medium and amino acid uptake by *in vitro*-produced bovine morulae and blastocysts. **Biol. Reprod.**, v.55, p.1383-1389, 1996.

LIU, Z.; FOOTE, R.H. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and five percent O₂. **Biol. Reprod.**, v.53, p.786-790, 1995.

MANJUNATHA, B.M.; DEVARAJ, M.; GUPTA, P.S.; RAVINDRA, J.P.; NANDI, S. Effect of taurine and melatonin in the culture medium on buffalo *in vitro* embryo development. **Reprod. Domest. Anim.**, v.44, p.12-16, 2009.

MARTINS JÚNIOR, A.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B.G. Use of recombinant gonadotrophins for embryo production in vitro. **Theriogenology**, v.49, p.292, 1998.

MARTINS JÚNIOR, A.; BRACKETT, B.G. Bovine blastocyst development in chemically defined media after *in vitro* maturation with low concentration of recombinant human FSH. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.27, p.398-400, 2003.

- MARTINS JÚNIOR, A.; SILVA, R.B.; ZANON, J.E.O.; CALEGARI, R.S.; VERONA, D. Beneficial effect of catalase on development of bovine embryos. **Biol. Reprod.**, v.68, p.338-339, 2003.
- MARTINS JÚNIOR, A.; CALEGARI, R.S.; PASCHOAL, D.M.; KOIVISTO, M.B.; FERRO, A.C. Development of bovine *in vitro*-produced embryos after oocyte maturation with recombinant gonadotropins and IGF-1 in chemically defined conditions. **Biol. Reprod.**, v.71, p.245, 2004.
- MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F.; BALDASSARRE, H. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured *in vitro*. **Mol. Reprod. Dev.**, v.42, p.432-436, 1995.
- MEIZEL, S. Stimulation of sperm fertility *in vitro* by exogenous molecules. **Reproduccion**, v.5, p.169-76, 1981.
- MILLER, J.G.O.; SCHULTZ, G.A. Amino acid content of preimplantation embryos and fluids of the reproductive tract. **Biol. Reprod.**, v.36, p.125-129, 1987.
- MOORE, K.; BONDIOLI, K.R. Glycine and alanine supplementation of culture medium enhances development of *in vitro* matured and fertilized cattle embryos. **Biol. Reprod.**, v.48, p.833-840, 1993.
- PARTRIDGE, R.J.; PULLAR, D.; WRATHALL, A.E.; LEESE, H.J. Consumption of amino acids by *in vivo* and *in vitro*-derived bovine embryos. **Theriogenology**, v.45, p.181, 1996.
- RANGASAMY, S.; KULASEKAR, K.; BALASUBRAMANIAN, S.; RAJ, G.D. Taurine supplementation during *in vitro* culture on ovine embryo development. **Indian Vet. J.**, v.84, p.107-108, 2007.
- ROUSSEAU, J.P.; MENEZO, Y. Role of the female genital tract in the transport and survival of gametes and the fertilized egg. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M.C.; HUNTER, R.H.F. **Reproduction in mammals and man**. Paris: Ellipses. 1993. p.368-386.
- SCHULTZ, G.; KAYE, P.L.; McCOY, D.J.; JOHNSON, M.H. Endogenous amino acid pool sizes in mouse eggs and preimplantation embryos. **J. Reprod. Fertil.**, v.61, p.387-393, 1981.
- TAKAHASHI, Y.; KANAGAWA, H. Effects of glutamine, glycine and taurine on the development of *in vitro* fertilized bovine zygotes in a chemically defined medium. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 60, p.443-447, 1998.
- TRIMBRELL, J.A.; SEABRA, V.; WATERFIELD, C.J. The *in vivo* and *in vitro* protective properties of taurine. **Gen. Pharmacol.**, v.26, p.453-462, 1995.
- VAN WINKLE, L.J.; HAGHIGHAT, N.; CAMPIONE, A.L. Glycine protects preimplantation mouse conceptuses from a detrimental effect on development of the organic ions in oviductal fluid. **J. Exp. Zool.**, v.253, p.215-219, 1990.
- XIA, P.; RUTLEDGE, J.; ARMSTRONG, D.T. Expression of glycine cleavage system and effect of glycine on *in vitro* maturation, fertilization and early embryonic development in pigs. **Anim. Reprod. Sci.**, v.38, p.155-65, 1995.
- WARD, F.; ENRIGHT, B.; RIZOS, D.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Optimization of *in vitro* bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. **Theriogenology**, v.57, p.2105-2117, 2002.

WALKER, S.K.; HILL, J.L.; KLEEMAN, D.O. NANCARROW, C.D. Development of ovine embryos in synthetic oviductal fluid containing amino acids at oviductal concentrations. **Biol. Reprod.**, v.55, p.703-708, 1996.

WRIGHT, R.W; BONDIOLI, K.R. Aspects of in vitro fertilization and embryo culture of domestic animals. **J. Anim. Sci.**, v.53, p.702-729, 1981.

Recebido em: 23/01/2008

Aceito em: 12/08/2008