

GIANCARLO MAGALHÃES DOS SANTOS

**DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO E MEIOS PARA  
O TRANSPORTE NA TAXA DE MATURAÇÃO “IN VITRO”  
DE OVÓCITOS BOVINOS.**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2008**

GIANCARLO MAGALHÃES DOS SANTOS

**DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO E MEIOS PARA  
O TRANSPORTE NA TAXA DE MATURAÇÃO “IN VITRO”  
DE OVÓCITOS BOVINOS.**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

APROVADA: 14 de julho de 2008

---

Prof. Carlos Antônio de C. Fernandes  
(Co-orientador)

---

Prof. Tarcizio Antônio Rêgo de Paula  
(Co-orientador)

---

Prof. José Domingos Guimarães

---

Prof. Orlando Marcelo Vendramini

---

Prof. Eduardo Paulino da Costa  
(Orientador)

## **DEDICO**

Na vida, nós nos deparamos com pessoas comuns, mas que se fazem especiais, aconselhando-nos com um sorriso transparente, mesmo quando o semblante parece cansado. Especiais, sim, por serem capazes de conquistar o outro com humildade. Dentre essas pessoas, encontrei uma aqui em Viçosa, que, na simplicidade de seus gestos, no conforto das suas palavras, na alegria do seu sorriso amigo, na paciência nas horas difíceis, ficou uma certeza: foi imprescindível na minha caminhada. Portanto, dedico essa dissertação a José Cândido, mais conhecido como senhor Nenzinho, que, justamente agora, completa seus 35 anos de serviço e, tenho muita certeza de que todos esses anos foram extremamente dedicados ao trabalho honesto e sincero. Agradeço ao desempenho prestado no auxílio em meu dia-a-dia, pela sua paciência, pelo seu respeito ao meu aprendizado e, principalmente, pela sua colaboração, detalhes que podem parecer simples, mas indispensáveis ao meu desenvolvimento e aprimoramento científico.

"Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve. E a vida é muito boa para ser insignificante."

**Charles Chaplin**

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por mais essa vitória, pela força concedida na realização dos meus sonhos.

Agradecimento especial aos meus pais, Carlos Emílio e Maria Aparecida, que acreditaram no meu sonho e estiveram sempre a meu lado, acompanhando-me a cada degrau superado rumo a esta realização.

Ao meu irmão Carlos Eduardo, que me entusiasmou e pelo apoio à minha participação na seleção do mestrado, além da companhia diária nesse período, sempre me aconselhando e ajudando em tudo de que precisei.

Aos meus irmãos, Leonardo e Vinícius que, apesar da distância, estão sempre torcendo por mim.

À Maria Carolina, que, apesar da distância, esteve sempre ao meu lado, apoiando-me e dando-me forças para a realização desse sonho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Medicina Veterinária, pelo acolhimento para a realização de mais este curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Eduardo Paulino da Costa, pela orientação, pelos ensinamentos e, principalmente, pela amizade.

Aos membros da banca, pela honrosa participação na defesa e pelas sugestões valiosas, que contribuíram para o engrandecimento deste trabalho.

Aos amigos Leonardo, Leandro e Welison, pela amizade construída entre nós que, com certeza, nos acompanhará ao longo de nossas vidas, pelas gargalhadas nos momentos de descontração na república.

A Maurinho, Heloísa, Manuela, Carolina e Mariana, pelos deliciosos almoços de domingo, fazendo-me lembrar da família distante.

Ao Maitan, integrante da família viçosense, pelos momentos em família, os encontros e principalmente as festas.

Aos professores Fernando, Graziela e Giuliano, pelos ensinamentos prestados e orientação no início desta caminhada pela vida científica.

Aos amigos e colegas do Curso de Pós-Graduação, Rafael, José Rogério, Flávio, Gustavo, Sanely, Rogério, Leonardo, Erick, Bruno, Marcelo, Morgana, Fábio, André Ricardo, pela agradável convivência, pela amizade e auxílios prestados.

Aos estagiários Emílio, Mariani, Marla, Juliana (morena), Juliana (loira), Manuela, Clóvis, pelos auxílios prestados no laboratório.

Ao proprietário do Frigorífico Mendonça e Silva (Ubá-MG) e aos seus funcionários, pessoas simples mas que se dedicam ao trabalho com a maior alegria, pela colaboração na obtenção dos ovários utilizados neste trabalho.

À Rosi, secretária da Pós-graduação da Veterinária, mãe dos pós-graduandos, pelo acolhimento, orientações e pela amizade construída ao longo do curso.

Aos funcionários Lorival e Divino do setor gado de corte, pelos auxílios prestados nas aulas práticas.

Aos funcionários do Setor de Transportes da UFV, pelas diversas viagens prestadas até o frigorífico, garantindo segurança e pontualidade.

Ao ex-chefe do Departamento de Veterinária Cláudio e ao atual, José Domingos, por liberar as viagens para o frigorífico.

A Geraldinho, pela gentileza de marcar as viagens para Ubá, sempre que necessário.

Se hoje comemoro mais uma conquista, ela se deve a vocês que estiveram ao meu lado em todos os momentos, que fizeram de meus sonhos seus próprios objetivos e de meus objetivos sua própria luta. Neste momento de alegria, em que celebro o final de uma etapa da Pós-Graduação (Mestrado), agradeço a todos vocês que, pela amizade ou pelo simples convívio, me apontaram o caminho. A todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, que, para mim, é mais que um trabalho, mas, sim, sonho, o meu muito obrigado.

## **BIOGRAFIA**

GIANCARLO MAGALHÃES DOS SANTOS, filho de Carlos Emílio Martins dos Santos e Maria Aparecida Magalhães dos Santos, nasceu na cidade de Alegre, Espírito Santo, em 18 de junho de 1982.

Em fevereiro de 2001, ingressou no Centro Universitário de Vila Velha - E.S., graduando-se em Medicina Veterinária em julho de 2006.

Em outubro de 2006, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, a nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, tendo defendido dissertação em 14 de julho de 2008.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
LISTA DE TABELA .....	ix
RESUMO .....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos .....	3
2.2. Maturação nuclear e citoplasmática do ovócito .....	4
2.3. Fatores que interferem na competência do ovócito .....	6
2.4. Meios utilizados para o transporte de ovócitos .....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Localização .....	13
3.2. Coleta dos ovários .....	13
3.3. Manipulação dos ovócitos.....	13
3.4. Delineamento experimental .....	14
3.5. Maturação " <i>in vitro</i> " de ovócitos após exposição a diferentes tempos e meios de transporte .....	15
3.6. Avaliação da taxa de maturação nuclear " <i>in vitro</i> " .....	16
3.7. Análise estatística .....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	17
5. CONCLUSÕES.....	24
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

## LISTA DE TABELA

	<b>Página</b>
Tabela 1 Distribuição dos tratamentos propostos no delineamento experimental de ovócitos imaturos de bovinos.....	15
Tabela 2 Taxa de maturação nuclear de acordo com cada tratamento para ovócitos imaturos de bovinos.....	17

## RESUMO

SANTOS, Giancarlo Magalhães dos, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2008. **DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO E MEIOS PARA O TRANSPORTE NA TAXA DE MATURAÇÃO “IN VITRO” DE OVÓCITOS BOVINOS.** Orientador: Eduardo Paulino da Costa. Co-orientadores: Carlos Antônio de Carvalho Fernandes, Tarcízio Antônio Rêgo de Paula, Luiz Sérgio de Almeida Camargo e João Henrique Moreira Viana.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar e comparar a influência dos diferentes tempos de exposição e meios no transporte de ovócitos imaturos bovinos sobre a taxa de maturação *in vitro*. Foram utilizados 799 ovócitos imaturos, distribuídos em dez tratamentos, sendo um controle. Foram testados três meios de transporte: Talp-Hepes, segundo BAVISTER *et al.* (1983); Talp-Hepes modificado, acrescido de 10 µg/mL de FSH e 0,0454 mM de Piruvato de Sódio e TCM modificado sem NaHCO<sub>3</sub>, acrescido de 5,665 mM de Hepes, 0,999 mM de NaCl, 0,0412 mM de Lactato de Cálcio, 0,0454 mM de Piruvato de Sódio, 10.000 UI de Penicilina G sódica, 0,005g% de Estreptomicina, 0,4g% de BSA e 10 µg/mL de FSH. Em cada um dos meios utilizados, os ovócitos foram mantidos em placa aquecida a 38°C por um período de duas, quatro e oito horas. Após o término do tempo de exposição, os ovócitos foram submetidos a cultivo *in vitro* em meio TCM 199 acrescido de 10% de SVE e 10 µg/mL de FSH, em estufa de CO<sub>2</sub>, por 24 horas, para posterior avaliação da taxa de maturação nuclear. No tratamento controle, após a decantação e seleção dos ovócitos, eles foram imediatamente submetidos ao procedimento de cultivo *in vitro*. Observou-se que nos tratamentos com Talp-Hepes em tempos de duas, quatro e oito horas foram obtidas taxas de maturação nuclear de 84,7; 81,2 e 81,3%, respectivamente. No meio Talp-Hepes modificado foram registradas taxas de 72,2; 82,0 e 82,2%, e no meio TCM modificado, taxas de 80,0; 78,6 e 80,0%, respectivamente, para os tempos duas, quatro e oito horas. No tratamento controle, observou-se 80,1% de metáfase II. Conclui-se que os meios utilizados para o transporte dos ovócitos imaturos e o tempo decorrido da coleta até incubação para a maturação *in vitro* não influenciaram ( $P>0,05$ ) a taxa de maturação nuclear. Deste modo, estes meios se mostram uma possível alternativa para o transporte dos ovócitos bovinos destinados à produção *in vitro* de embriões.

## ABSTRACT

SANTOS, Giancarlo Magalhães dos, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2008. **DIFFERENT EXPOSITION TIMES AND TRANSPORTATION MEDIA ON "IN VITRO" MATURATION RATE OF BOVINE OOCYTES.** Adviser: Eduardo Paulino da Costa. Co-advisers: Carlos Antônio de Carvalho Fernandes, Tarcízio Antônio Rêgo de Paula, Luiz Sérgio de Almeida Camargo and João Henrique Moreira Viana.

The objective of this work was to assess and compare the influence of different exposition time and transportation media on *in vitro* maturation of immature bovine oocytes. We used 799 immature oocytes, distributed in ten treatments, one of them, the control. Three transportation media were tested: Talp-Hepes, according to BAVISTER *et al.* (1983); modified Talp-Hepes, with 10 µg/mL of FSH and 0,0454 mM of Sodium Piruvate and modified TCM without NaHCO<sub>3</sub>, with 5,665 mM of Hepes, 0,999 mM of NaCl, 0,0412 mM of Calcium Lactate, 0,0454 mM of Sodium Piruvate, 10.000 UI of Sodic Penicillin G, 0,005g% of Streptomycin, 0,4g% of BSA and 10 µg/mL of FSH. In each of the used media, the oocyte were kept on a plate and heated at 38°C for two, four and eight hours. After this time, the oocytes were submitted to *in vitro* cultivation in TCM 199 media with 10% of SVE and 10 µg/mL of FSH, in CO<sub>2</sub> oven, for 24 hours, for later nuclear maturation rate evaluation. In the control, after the oocyte decanting and selection, they were immediately submitted to *in vitro* cultivation procedure. We observed that in the Talp-Hepes treatment with two, four and eight hours, the nuclear maturation rates were 84,7; 81,2 and 81,3%, respectively. In the modified Talp-Hepes media the rates were 72,2; 82,0 and 82,2%, and the modified TCM media the rates were 80,0; 78,6 and 80,0%, respectively to two, four and eight hours. In the control we observed 80,1% in metaphase II stage. Concluding, the transportation media and the time between the collection and the incubation for *in vitro* maturation didn't influence ( $P>0,05$ ) the nuclear maturation rate. So, these media can be a possible alternative to the bovine oocytes transportation for *in vitro* embryo production.

## 1. INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira passa por um processo de transformação, em que se tenta maximizar a produtividade, trabalhando com eficiência e utilizando tecnologias que permitem lucro na produção. Dentre estas tecnologias, está a produção de embriões *in vitro* (PIV), que possibilita a multiplicação rápida e eficiente do material genético, permitindo maior intensidade de seleção do rebanho.

O Brasil atualmente ocupa posição de destaque, com 50% da produção por fecundação *in vitro* (FIV) de embriões bovinos do mundo (VIANA e CAMARGO, 2007). Entretanto, apesar de difundida mundialmente e ser reconhecida como valiosa ferramenta para o melhoramento genético animal, os resultados da PIV estão aquém de seu verdadeiro potencial, sendo sua utilização bastante limitada devido aos baixos resultados obtidos na taxa e qualidade de mórulas e blastocistos, além das reduzidas taxas de gestação e nascimentos.

Dentre as inúmeras pesquisas realizadas, a China foi o único país que apresentou evolução semelhante à do Brasil, porém com um panorama diferente, utilizando-se predominantemente ovócitos advindos de matadouros (VIANA e CAMARGO, 2007). No Brasil, a PIV é oriunda de ovócitos coletados de doadoras vivas por meio de aspiração folicular guiada por ultra-sonografia (*Ovum Pick-up, OPU*), que permite a obtenção de ovócitos uma ou duas vezes por semana, sem trauma aparente ao trato reprodutivo. Além disso, existe outro aspecto favorável que é a possibilidade de obter ovócitos de fêmeas a partir dos seis meses de idade e de fêmeas até o terceiro mês de prenhez (GONÇALVES *et al.*, 2007).

Ainda que todas as etapas do processo de PIV sejam importantes, sem dúvida, a manutenção do ovócito em um meio adequado, no decorrer do transporte até o laboratório, até que eles sejam maturados, é um ponto importante, uma vez que poderá interferir nas demais etapas, incrementando a

proporção de ovócitos clivados e, conseqüentemente, de embriões produzidos *in vitro*.

Desta forma, os ovócitos necessitam de condições controladas, sendo o meio utilizado, a duração do transporte e a temperatura entre a coleta e a chegada dos ovócitos no laboratório, aspectos que influenciam o desenvolvimento embrionário (WARD *et al.*, 2000).

Os meios mais difundidos para o transporte dos ovócitos têm sido o Talp-Hepes e o TCM-Hepes, em diferentes tempos e temperatura, além de meios previamente equilibrados em estufa de CO<sub>2</sub>. Contudo, existem poucos estudos relacionados às respectivas condições de transporte, maturação e ao desenvolvimento embrionário subsequente (LEIVAS *et al.*, 2001).

Da mesma forma, encontram-se os estudos quanto à avaliação da taxa de maturação nuclear após a utilização de diferentes meios e tempos de exposição no transporte. Na literatura pesquisada, existem somente trabalhos avaliando a taxa de clivagem e a produção de blastocistos. Assim, pesquisas relacionadas à avaliação da taxa de maturação nuclear são importantes, permitindo verificar se o comprometimento na produção dos embriões está relacionado à maturação nuclear ou citoplasmática, visto que, na média atual, apenas 35% dos ovócitos maturados se desenvolvem até o estágio de blastocisto.

Atualmente, busca-se alcançar uma alternativa prática e simples para o transporte de ovócitos obtidos por meio da OPU, que mantenha a viabilidade e a competência ovocitária, sua capacidade de sofrer maturação, fecundação e, assim, produzir embriões viáveis (GARCIA *et al.*, 1998), proporcionando incrementos nas taxas de gestação e diminuição de custos de produção (MIRANDA *et al.*, 2007).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência de diferentes tempos de exposição e meios no transporte de ovócitos imaturos bovinos sobre a taxa de maturação *in vitro*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Produção *in vitro* de embriões bovinos

A PIV de embriões no Brasil está aumentando, tendo como principal objetivo acelerar o ganho genético do rebanho bovino (TESSMANN *et al.*, 2004). Entretanto, a técnica apresenta limitações, sendo um dos principais problemas, os baixos resultados do desenvolvimento *in vitro* dos embriões, uma vez que, em média, de cada 100 ovócitos bovinos colocados para maturar, 70 a 80% são fertilizados *in vitro* e apenas 30 a 40% se desenvolvem até o estágio de blastocisto (MOORE *et al.*, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2007).

Evidências sugerem que, enquanto as condições de cultivo na PIV podem influenciar o potencial de desenvolvimento dos embriões bovinos, a qualidade intrínseca do ovócito é o fator chave que determina a proporção de ovócitos que se desenvolvem até blastocisto (LONERGAN e FAIR, 2008). Deste modo, ovócitos de boa qualidade, com boas características morfológicas e de desenvolvimento, são o primeiro requisito para o sucesso da produção *in vitro* de embriões, caso contrário, os índices podem ser ainda menores (SENEDA *et al.*, 2001).

Segundo PEIXER *et al.* (1995), além dos baixos índices de blastocistos, a PIV ainda apresenta outras limitações como a qualidade biológica e as dificuldades na criopreservação dos embriões, a menor viabilidade dos ovócitos obtidos de bezerras em relação aos de vacas e novilhas e o custo, que pode ser superior ao do embrião produzido pela transferência de embriões (TE). De acordo com MIRANDA *et al.* (2007), o custo do embrião produzido ainda continua alto em função da necessidade de infra-estrutura laboratorial, que inclui equipamentos importados e de alto custo, bem como meios e reagentes para o cultivo celular/embrião, em sua maioria, também de origem importada e de difícil aquisição.

Para a obtenção de melhores resultados com a técnica, muitos estudos devem ser realizados visando a avaliar individualmente cada uma das etapas, procurando ajustar, da melhor maneira possível, todas as variáveis envolvidas no processo.

## **2.2. Maturação Nuclear e Citoplasmática do Ovócito**

Um dos principais motivos de a PIV apresentar reduzida eficiência é a falta de competência dos ovócitos antes da maturação. Em condições *in vivo*, o reinício da meiose ou maturação ocorre após o pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH) durante o estro e, momentos antes da ovulação, são observadas modificações citoplasmáticas. Neste mecanismo, estão envolvidas a síntese de proteínas e as mudanças no número, tamanho e posição de organelas, tais como a migração periférica dos grânulos corticais. Já *in vitro*, a simples retirada do ovócito do contato com as células foliculares é suficiente para dar início ao processo de maturação nuclear, ou seja, a meiose é retomada espontaneamente (MAYES e SIRARD, 2001; GONÇALVES *et al.*, 2002).

A maturação nuclear do ovócito compreende a progressão do estágio diplóteno da primeira prófase meiótica ou estágio de vesícula germinativa (VG), seguida das fases de metáfase I (MI), anáfase I e telófase I, até a fase de metáfase II (MII), quando então ocorrerá a expulsão do primeiro corpúsculo polar (CP), ocorrendo, assim, a segunda parada da meiose (DURANTHON e RENARD, 2001; FIGUEIREDO *et al.*, 2002; GONÇALVES *et al.* 2007).

A duração necessária para a conclusão da primeira divisão meiótica de ovócitos bovinos *in vitro* varia de 18 a 24 horas (SÜSS *et al.*, 1988; HYTTEL *et al.*, 1989). Contudo, há uma seqüência de eventos para a maturação nuclear, sendo que o processo de quebra da vesícula germinativa (QVG), *in vitro*, ocorre entre sete e 12 horas após o início do cultivo, enquanto a MI ocorre entre 12 e 15 horas e a MII a partir de 18 horas, com a eliminação do corpúsculo polar entre 18 e 21 horas. Após seis a sete horas, o CP se degenera, não podendo mais ser observado (HYTTEL *et al.*, 1989).

A correta ocorrência desta seqüência de eventos é muito importante, pois a habilidade do ovócito em ser fertilizado e desenvolver normalmente depende tanto da maturação nuclear quanto da citoplasmática (HURTT *et al.*, 2000). O ovócito somente reiniciará a segunda parada da meiose se for fecundado pelo espermatozóide (FIGUEIREDO *et al.*, 2002).

Durante o crescimento folicular, os ovócitos adquirem sua competência progressivamente. O fato de estes chegarem ao estágio de MII *in vitro* não necessariamente significa que sejam competentes para suportar uma fecundação normal e posterior desenvolvimento embrionário *in vitro* (CROZET *et al.*, 1995). Isso demonstra que a capacidade de completar a maturação citoplasmática se desenvolve além da maturação nuclear (DODE *et al.*, 2000).

A maturação representa o estágio final da preparação do ovócito para a fecundação. Nesse período, mudanças morfológicas e bioquímicas, denominadas em seu conjunto de maturação citoplasmática, são essenciais para completar a meiose e para seu desenvolvimento futuro (DONNAY *et al.*, 2004).

Deste modo, a redistribuição das organelas intracelulares (mitocôndrias migram para posição perinuclear e grânulos corticais depositam-se abaixo da membrana vitelina) e a maturação dos mecanismos de liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  são alguns dos eventos citoplasmáticos que ocorrem no ovócito (MERMILLOD *et al.*, 2000). Este gameta e a população de células da granulosa e do *cumulus* encontram-se interconectados por uma rede extensiva transmembrana de canais conhecidos como junções *gap* (HYTTEL *et al.*, 1989). As funções dessas junções *gap* são diversas, pois permitem a passagem de substâncias de baixo peso molecular via células do *cumulus* (GORDON, 1994), transmitindo sinais elétricos e transportando moléculas mensageiras das células foliculares ao ovócito. Mensageiros como adenosina monofosfato cíclica (cAMP) e  $\text{Ca}^{2+}$  podem passar através das junções *gap* para as células vizinhas, propagando sinais induzidos por estimulação hormonal (LAWRENCE *et al.*, 1978). A integridade das junções *gap* ainda parece ser essencial para dar suporte ao processo de fecundação (TANGHE *et al.*, 2003).

Já os eventos moleculares relacionados à maturação citoplasmática não são ainda totalmente conhecidos, mas suspeita-se que transcritos e proteínas são estocadas em uma forma estável durante este período e têm uma

importante função durante o desenvolvimento embrionário precoce, quando o genoma embrionário permanece quiescente (MERMILLOD *et al.*, 2000).

Os ovócitos com uma maturação nuclear normal, em tempo regular, mas que possuem uma assincronia entre a maturação citoplasmática e a nuclear, não serão fecundados ou não irão ter um desenvolvimento embrionário (BLONDIN e SIRARD, 1995; BEVERS *et al.*, 1997).

### **2.3. Fatores que interferem na competência do ovócito**

Sabe-se que o crescimento do ovócito dentro do folículo ovariano é determinado por grande número de fatores que influenciam sua viabilidade e competência para o desenvolvimento *in vitro* (FAIR *et al.*, 1995). Dentre esses fatores, estão incluídos: tamanho folicular (LONERGAN *et al.*, 1994; HENDRIKSEN *et al.*, 2000; DODE *et al.*, 2000); dia do ciclo estral (MACHATKOVÁ *et al.*, 1996); nível de atresia (HAGEMANN, 1999; HENDRIKSEN, *et al.*, 2004); e meio utilizado para o transporte (GARCIA *et al.*, 1998), além do local de maturação, ou seja, *in vivo* ou *in vitro* (HENDRIKSEN *et al.*, 2000).

O ovócito para ser fertilizado *in vivo* é obtido pela ovulação de um folículo saudável durante uma fase específica do ciclo estral, ao contrário dos ovócitos colhidos para a PIV que são obtidos de folículos em diferentes estádios do desenvolvimento (HENDRIKSEN, *et al.*, 2000; CASTILHO e GARCIA, 2005) e em fases distintas do ciclo estral (MACHATKOVÁ *et al.*, 1996). Desta forma, são expostos a diferentes concentrações hormonais, podendo levar a uma diminuição na competência ovocitária (MACHATKOVÁ *et al.*, 2004). Sob este enfoque, a origem folicular tem uma influência significativa no potencial de desenvolvimento do ovócito, e a partir do momento em que ele é retirado do folículo, seu potencial de desenvolvimento já se torna comprometido (LONERGAN e FAIR, 2008).

HENDRIKSEN *et al.* (2000) relataram que a competência para o desenvolvimento *in vitro* é maior para ovócitos oriundos de folículos de seis a oito milímetros, quando comparado com folículos de três a seis milímetros de diâmetro. Logo, folículos maiores que seis milímetros possuem ovócitos com

maior potencial para se tornar blastocisto, que folículos pequenos (menor que três milímetros), os quais possuem ovócitos incompetentes (PAVLOK *et al.*, 1992; LONERGAN *et al.*, 1994). Sendo assim, a competência do ovócito aumenta na medida em que o folículo se desenvolve (KRUIP *et al.*, 2000). Portanto, baixas taxas no desenvolvimento de ovócitos em folículos menores podem estar relacionadas ao fato de estes não terem alcançado completamente a meiose e/ou a competência citoplasmática, ou talvez sejam provenientes de folículos em atresia (CAMARGO *et al.*, 2006).

Da mesma forma, PAVLOK *et al.* (1992) e FAIR *et al.* (1995) mostraram que ovócitos provenientes de folículos com menos de dois milímetros de diâmetro apresentaram taxa de maturação nuclear menor do que aqueles ovócitos de folículos acima de três milímetros. HYTTEL *et al.* (1997) também relatam que a competência do ovócito parece ser adquirida quando o tamanho do folículo apresenta cerca de três milímetros, que correspondem a um ovócito com diâmetro de aproximadamente 100µm.

CAROLAN *et al.* (1996) e SENEDA *et al.* (2001), porém, não observaram influência do tamanho folicular sobre a competência do ovócito. Corroborando estas observações, DODE *et al.* (2000), ao avaliar o tamanho do folículo (um a nove milímetros) na maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos de fêmeas zebuínas (*Bos indicus*), não observaram diferença na taxa de maturação nuclear, tendo mais de 80% dos ovócitos atingido o estágio de metáfase II no período de 24 horas de cultivo. Essas taxas de maturação são semelhantes às citadas na literatura quanto a *Bos taurus* (KIM *et al.*, 1996; GANDOLFI *et al.*, 1997).

Vários estudos têm demonstrado que a fase do ciclo estral também influencia na competência ovocitária. Diante disso, MACHATKOVA *et al.* (1996), comparando a aspiração em diferentes estádios do ciclo estral, demonstraram que ovócitos colhidos nos dias 14 a 16 do ciclo apresentavam melhores índices de competência para o desenvolvimento até blastocisto quando comparados aos aspirados nos dias sete, oito e nove.

HAGEMAN (1999) e MACHATKOVA *et al.* (2004) concluíram que o desenvolvimento até blastocisto é significativamente maior em ovócitos colhidos durante a fase de crescimento folicular comparado à fase de dominância, independentemente do diâmetro do folículo. E a competência

ovocitária tendeu a aumentar em ovócitos oriundos de folículos maiores. Entretanto, folículos com o mesmo diâmetro podem ser encontrados em diversas fases do ciclo estral, podendo estar em crescimento ou em processo de atresia (CAMARGO *et al.*, 2006).

Outro aspecto importante é que ovócitos aspirados de animais pré-púberes possuem uma menor atividade metabólica (KRISHER *et al.*, 2007) e, por isso, são menos competentes para a PIV de embriões bovinos do que animais adultos (REVEL *et al.*, 1995). Da mesma forma, ovócitos recuperados sem estimulação da doadora e com frequência de punção de uma vez/semana têm qualidade inferior aos ovócitos coletados duas vezes/semana (GOODHAND *et al.*, 1999).

A estimulação hormonal pode alterar o ambiente folicular ao redor do ovócito, influenciando direta ou indiretamente a qualidade do ovócito aspirado (ROTH *et al.*, 2002). Logo, o uso de hormônio folículo estimulante (FSH) antes da OPU beneficia o desenvolvimento embrionário por sincronizar a população folicular, adiantando o desenvolvimento dos folículos e iniciando a maturação *in vivo* dos ovócitos, o que levaria a um aumento da competência de desenvolvimento ovocitário antes da sua recuperação (GIBBONS *et al.*, 1994). Corroborando estes resultados, RAMOS *et al.* (2006) demonstraram que a pré-estimulação ovariana com FSH antes da punção folicular pode melhorar a qualidade e a taxa de clivagem dos ovócitos recuperados de vacas da raça Gir.

Entretanto, DUROCHER *et al.* (2006), ao avaliar o efeito da estimulação hormonal com FSH na resposta folicular e na competência de desenvolvimento do ovócito bovino, por períodos curtos e longos, afirmaram que este efeito não afeta a resposta ovariana ou as taxas de desenvolvimento após a FIV. Já, GREVE *et al.* (1995) relatam que a superestimulação ovariana com FSH prejudica a competência do ovócito por alterar a duração da fase folicular.

Ao compararem o tipo de maturação do ovócito, HYTTEL *et al.* (1997) e LONERGAN *et al.* (2001) relatam que a maturação *in vivo* apresenta uma competência maior quando comparada à maturação *in vitro*. Embora ovócitos maturados *in vitro* provenientes de folículos pré-ovulatórios produzam maior taxa de blastocisto quando comparados a folículos em crescimento, observa-se que a maturação *in vivo* é mais eficiente que aquela *in vitro*, até mesmo depois do desenvolvimento do folículo pré-ovulatório (HENDRIKSEN *et al.*, 2000).

Porém, GONÇALVES *et al.* (2007) relatam que a maturação nuclear, fecundação e clivagem de ovócitos maturados *in vitro* não diferem significativamente daqueles maturados *in vivo*.

HENDRIKSEN *et al.* (2000), ao avaliar o desenvolvimento embrionário de ovócitos maturados por seis horas *in vivo* e posteriormente maturados por 16 horas *in vitro*, observaram uma taxa similar de blastocisto quando comparados a ovócitos maturados *in vitro* por 24 horas: 51 e 55%, respectivamente). Estes pesquisadores concluíram que o efeito da maturação *in vivo* ainda não é estabelecido dentro das primeiras seis horas.

Para a maturação *in vitro*, os ovócitos são obtidos de folículos com dois a oito milímetros de diâmetro, os quais *in vivo* demorariam de quatro a 10 dias para atingir uma possível ovulação. Já na maturação *in vivo*, estes ovócitos recomeçam a meiose com 15 mm de diâmetro, ou seja, enquanto o folículo dominante cresce de quatro para 15 mm em aproximadamente cinco dias, na MIV esse período é reduzido para 24h, que é o tempo de cultivo (PAVLOK *et al.*, 1992). Porém, a duração da MIV é limitado a 24 horas na maioria das espécies, e o prolongamento deste tempo leva ao envelhecimento do ovócito, diminuindo assim sua capacidade de ser fertilizado (DONNAY *et al.*, 2004).

#### **2.4. Meios utilizados para o transporte de ovócitos**

O meio utilizado para o transporte e manutenção do ovócito é um dos principais fatores que interferem no desenvolvimento embrionário na PIV (GARCIA *et al.*, 1998). No Brasil, pela sua grande extensão, este período pode levar várias horas. O curto tempo de exposição do ovócito ao meio (geralmente, quatro horas) já é um fator determinante, pois prejudica a maturação *in vitro*, enfatizando assim que as limitações ainda persistem (KURTZ FILHO *et al.*, 2003).

Deste modo, como as grandes distâncias entre as fazendas e os laboratórios têm sido um entrave para a PIV, o transporte de Complexos *Cumulus*-Oócitos (CCO) recuperados de doadoras vivas por OPU tem sido objetivo de várias pesquisas (PINTO *et al.*, 2002; ALVES *et al.*, 2003; KURTZ FILHO *et al.*, 2003; CORDEIRO *et al.*, 2006).

Por tal razão, em condições de campo, o meio para estocagem temporária deve ser o menos complexo possível, devido a ocasionais mudanças em função do tempo de estocagem, temperatura (GORDON, 1994) e pH (TESSMANN *et al.*, 2004), já que os CCOs são bastante sensíveis a essas variações.

Diante disso, o tampão orgânico Hepes *N*-(2-hidroxietil) piperazina-*N'*-(2-ácido etanosulfônico) vem sendo utilizado amplamente em meios de transporte de ovócitos imaturos de bovinos, para evitar essas grandes variações de pH (FRY *et al.*, 2000; MONTAGNER *et al.*, 2000). Sendo assim, o meio Talp-Hepes (SCHERTHANER *et al.*, 1998) e o TCM-Hepes (TWAGIRAMUNGU *et al.*, 1998; SCHWARTZ *et al.*, 1998; GARCIA *et al.*, 1998; FRY *et al.*, 2000; LEIVAS *et al.*, 2002) têm sido os mais utilizados neste transporte do gameta feminino (FERRAZ *et al.*, 2000).

As pesquisas desenvolvidas com CCO obtidos por meio de OPU por vários autores (GARCIA *et al.*, 1998; FRY *et al.*, 2000) com TCM-Hepes como meio de transporte antes da maturação, por três a cinco horas, à temperatura ambiente, resultaram na produção de blastocistos, dentro de limites aceitáveis. Já, ALVES *et al.* (2003) e KURTZ FILHO *et al.* (2003) demonstram que ovócitos podem ser cultivados em banho-maria a 39°C por 24 horas em meio TCM-Hepes, sendo que os ovócitos eram mantidos em tubos de um mililitro repletos de meio, sem controle da atmosfera gasosa. A composição do TCM-Hepes, utilizada por ambos foi praticamente idêntica. A única diferença foi que ALVES *et al.* (2003) utilizaram soro de égua em estro (SEE), e KURTZ FILHO *et al.* (2003), soro de vaca em estro (SVE). Deve-se enfatizar que a simplificação do processo de maturação sem atmosfera gasosa controlada é um fator importante a ser incorporado aos protocolos de OPU/PIV de embriões bovinos.

Por outro lado, LEIVAS *et al.* (2004) utilizaram o mesmo meio que ALVES *et al.* (2003), a única diferença é que foi adicionado de um milimolar de bicarbonato de sódio. Porém, utilizaram três tempos diferentes (seis, 12 e 18 horas) para o transporte, sendo este transporte feito em tubos de poliestireno cobertos com óleo mineral em banho-maria a 39°C, posteriormente, eles foram colocados para a maturação até completar 24 horas. Estes autores observaram

que há possibilidade de transporte neste meio de maturação por até 12 horas sem influenciar o desenvolvimento embrionário.

Há ainda o trabalho de TESSMANN *et al.* (2004) que, ao avaliar o transporte de ovócitos em palhetas de 0,25mL, utilizando como meio o TCM-Hepes adicionado de 0,01UI de rFSHh/mL e 0,5mg/mL de LH em garrafas térmicas e em banho-maria por seis horas a 38,5°C, sem controle da atmosfera gasosa e, sendo posteriormente maturados por 18 horas em estufa de CO<sub>2</sub>, também não observaram diferença no desenvolvimento embrionário. Estes mesmos autores avaliaram o transporte-maturação de ovócitos bovinos em palhetas, permanecendo em estufa de cultivo por 24 horas, sob temperatura constante, em bolsas plásticas seladas, impermeáveis a gases, e verificaram viabilidade de produção *in vitro* de embriões bovinos, sob essas condições.

Da mesma forma, outros meios também foram testados quanto à capacidade de desenvolvimento de ovócitos. Foram realizados a manutenção e o transporte em TCM-199 acrescido de bicarbonato (TWAGIRAMUNGU *et al.*, 1998; FRY *et al.*, 2000), ou em TCM + BSA (SCHERTHANER *et al.*, 1998; SCHWARTZ *et al.*, 1998), por períodos que chegaram a variar de cinco a 10h conforme a temperatura utilizada, tendo sido obtida uma taxa de blastocisto em torno de 25%. Resultados similares também foram obtidos por LEIVAS *et al.* (2001) com TCM 199 a 39 °C, sendo o meio de manutenção suplementado com hormônio hipofisiário.

A necessidade de gaseificação prévia de alguns desses meios em estufas de cultivo com atmosfera controlada se apresenta como uma desvantagem. Sendo assim, o principal motivo da diminuição da produção embrionária quando se realiza o transporte nessas condições por um período maior que seis horas (TWAGIRAMUNGU *et al.*, 1998) tem sido a variação no pH dos meios, reduzindo os índices de embriões na PIV. Por tal razão, o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) é utilizado para controlar o pH dos meios tamponados com bicarbonato (BOONE e SHAPIRO, 1990), havendo necessidade do uso de estufas ou sistemas alternativos para manter sua concentração (CORDEIRO *et al.*, 2006).

Com uma solução totalmente diferente das utilizadas, CORDEIRO *et al.*, (2006) testaram um meio à base de água de coco (osmolaridade final: 290 mOsmol/L e pH: 7,2) na manutenção de ovócitos bovinos comparativamente

com o meio TCM 199-Hepes em diferentes períodos de transporte (seis, nove e 12 horas). A solução à base de água de coco e o TCM 199-Hepes foram igualmente eficazes em preservar a viabilidade do ovócito para o processo de PIV por até seis horas.

Além destes meios líquidos biológicos, também é utilizado na manutenção de ovócitos o líquido folicular bovino (LFb) obtido de folículos entre dois e oito milímetros de diâmetro (LEHMKUHL *et al.*, 2000; PINTO *et al.*, 2002; ALVES *et al.*, 2003). É importante ressaltar o risco de introdução e transmissão de agentes infecciosos que possam estar presentes neste fluido (STRINGFELLOW *et al.*, 2000), além de influenciar os resultados de PIV devido à variabilidade de partidas do LFb (LEHMKUHL *et al.*, 2000). PINTO *et al.* (2002) e ALVES *et al.* (2003) verificaram que a manutenção de ovócitos por seis horas em líquido folicular bovino não influencia a taxa do desenvolvimento embrionário.

O LFb, além de ser utilizado para o transporte de ovócitos, também tem sido utilizado como inibidor do reinício da meiose (DODE *et al.*, 2000). A retenção do ovócito na fase de vesícula germinativa após a retirada do folículo é uma alternativa para favorecer a competência para que se desenvolva após a fecundação. No intuito de demonstrar que o LFb age como inibidor da meiose, LEHMKUHL *et al.* (2000) mantiveram ovócitos em LFb por cinco horas, tendo observado no fim deste período que 66,00% deles estavam em estágio de vesícula germinativa, 25,00% quebraram a vesícula germinativa e 8,30% em metáfase I.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Localização**

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (LRA/DVT/UFV). Foram utilizados ovários coletados de fêmeas bovinas, sem raça e idade definidas e em diferentes fases do ciclo estral, abatidas em frigorífico localizado a 60 km do laboratório.

#### **3.2. Coleta dos ovários**

Os ovários foram coletados no frigorífico imediatamente após o abate e evisceração. Após a coleta, foram imersos em garrafa térmica com solução fisiológica acrescida de sulfato de estreptomicina (SIRARD e BILODEAU, 1990), em temperatura variando de 35 a 38°C. Em seguida, ao término da coleta, foram transportados até o laboratório, num tempo máximo de duas horas.

#### **3.3. Manipulação dos ovócitos**

No laboratório, os ovários foram transferidos para uma nova solução fisiológica acrescida de sulfato de estreptomicina e colocados em banho maria a 38°C. Imediatamente, os folículos ovarianos (entre 2 a 8 mm de diâmetro) foram puncionados por agulhas 25 x 7 gauge, acopladas a seringas de cinco mililitros. O líquido folicular contendo os ovócitos foi depositado num cálice cônico contendo 15 mL de meio de acordo com o tratamento, conforme descrito a seguir.

Ao término da aspiração, aguardaram-se aproximadamente cinco minutos para que ocorresse a decantação dos ovócitos. Posteriormente, o “pellet” contendo os ovócitos foi recuperado do fundo do cálice com auxílio de uma pipeta de Pasteur, sendo então, transferido para uma placa de Petri, contendo o mesmo meio da etapa anterior. Com auxílio de um microscópico estereoscópico e uma micropipeta, os ovócitos foram transferidos para outra placa de Petri contendo meio, de acordo com cada tratamento, e então classificados morfológicamente de acordo com COSTA *et al.* (1997a). Apenas os ovócitos imaturos classificados como *cumulus* compacto e com até três camadas de células do *cumulus* foram transferidos para uma terceira placa de Petri contendo o meio predeterminado de cada tratamento.

### 3.4. Delineamento experimental

Foram utilizados 799 ovócitos imaturos, distribuídos em dez tratamentos, sendo um controle, com três repetições para cada tratamento. Cada repetição continha cerca de 20 ovócitos, perfazendo uma média de 60 a 80 ovócitos por tratamento. Foram testados três meios de transporte, cuja composição foi a seguinte: Talp-Hepes (TH), segundo BAVISTER *et al.* (1983); Talp-Hepes modificado (TH mod), acrescido de 10 µg/mL de FSH e 0,0454 mM de Piruvato de Sódio e TCM modificado (TCM mod) sem NaHCO<sub>3</sub>, acrescido de 5,665 mM de Hepes, 0,999 mM de NaCl, 0,0412 mM de Lactato de Cálcio, 0,0454 mM de Piruvato de Sódio, 10.000 UI/mL de Penicilina G sódica, 0,005g% de Estreptomicina, 0,4g% de BSA e 10 µg/mL de FSH. Foi adicionado 10% de SVE inativado (56°C por 30 minutos) em cada um dos três meios. Todos estes meios de transporte eram mantidos aquecidos a 38°C.

Em cada um dos meios utilizados, os ovócitos permaneceram por duas, quatro ou oito horas, em placa aquecida a 38°C. Após o tempo de exposição, os ovócitos foram submetidos a cultivo *in vitro* para posterior avaliação da taxa de maturação nuclear. A distribuição dos tratamentos propostos encontra-se disposta na Tabela 1.

Tabela 1: Distribuição dos tratamentos propostos no delineamento experimental de ovócitos imaturos de bovinos

<b>Tratamento</b>	<b>Meio de transporte</b>	<b>Tempo de exposição (horas)</b>
T1	TH	2
T2	TH	4
T3	TH	8
T4	TH mod	2
T5	TH mod	4
T6	TH mod	8
T7	TCM mod	2
T8	TCM mod	4
T9	TCM mod	8
T10	Controle	0

O T10 foi considerado controle, o qual, após decantação e seleção, foi imediatamente submetido ao procedimento de maturação *in vitro*, conforme descrito posteriormente.

### **3.5. Maturação “*in vitro*” de ovócitos após exposição a diferentes tempos e meios de transporte**

O meio de maturação foi constituído por TCM 199 acrescido de 10% de SVE e 10 µg/mL de FSH (COSTA, 1994). A maturação foi realizada em placas Nunc (Nunc A/S; Cat.176740) de quatro poços, contendo aproximadamente 20 ovócitos em 600 µL de meio de maturação em cada poço, previamente equilibrado a 38,5°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de ar atmosférico e 95% de umidade em estufa incubadora. Os ovócitos foram cultivados nestas condições de temperatura e atmosfera durante 24 horas. Após este período, foram submetidos à avaliação da taxa de maturação nuclear.

### **3.6. Avaliação da taxa de maturação nuclear “in vitro”**

Para avaliação da taxa de maturação nuclear, os ovócitos de todos os tratamentos foram submetidos ao procedimento de remoção do *cumulus oophorus* (COSTA *et al.*, 1997b). Posteriormente, foram hipotonizados, fixados em lâmina e corados com orceína a 2%, segundo COSTA *et al.* (1997c). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico, com aumento de 1000X em imersão, para avaliar o estágio do ciclo celular meiótico. Os ovócitos foram classificados, de acordo com a configuração dos cromossomos, em metáfase II (MII), metáfase I (MI), cromatina condensada em grumos (CCG) ou sem configuração cromossômica (SCC). Foi considerado como maturação nuclear, o ovócito que apresentasse configuração cromossômica em metáfase II e também o grupo cromossômico pertencente ao primeiro corpúsculo polar, quando presente.

### **3.7. Análise estatística**

As taxas de maturação nuclear foram comparadas em tabelas de contingência e analisadas pelo teste de qui-quadrado a 5% de probabilidade (Sampaio, 2002).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, os meios utilizados para o transporte dos ovócitos imaturos de bovino e o tempo decorrido da colheita até a maturação *in vitro* não influenciaram ( $P>0,05$ ) a taxa de maturação nuclear (Tabela 2).

Tabela 2 – Taxa de maturação nuclear de acordo com cada tratamento para ovócitos imaturos de bovinos

Tratamento <sup>1</sup>	%MII (N)	%MI (N)	%Degenerados (N)	Total (N)
T1	84,7 (50)	10,2 (6)	5,1 (3)	59
T2	81,2 (56)	13,0 (9)	5,8 (4)	69
T3	81,3 (52)	12,5 (8)	6,3 (4)	64
T4	72,2 (52)	16,7 (12)	11,1 (8)	72
T5	82,0 (50)	13,1 (8)	4,9 (3)	61
T6	82,2 (60)	11,0 (8)	6,8 (5)	73
T7	80,0 (48)	16,7 (10)	3,3 (2)	60
T8	78,6 (55)	18,6 (13)	2,9 (2)	70
T9	80,0 (64)	11,3 (9)	8,8 (7)	80
T10	80,1 (153)	13,61 (26)	6,28 (12)	191

<sup>1</sup>Não houve diferença entre os tratamentos ( $P>0,05$ ) pelo teste do qui-quadrado.

MII: metáfase II; MI: metáfase I; Degenerados (inclusos ovócitos com cromatina condensada em grumos e sem configuração cromossômica); N: Número de ovócitos obtidos.

T1, T2 e T3 correspondem ao meio Talp-Hepes em tempo de 2, 4 e 8 horas, respectivamente. T4, T5 e T6 ao Talp-Hepes modificado e T7, T8 e T9 ao TCM modificado, sendo na mesma seqüência de horas do meio Talp-Hepes.

T10 corresponde ao tratamento controle, cultivado logo após a aspiração.

Com relação ao tratamento controle (tempo 0), não houve diferença ( $P>0,05$ ) pelo teste qui-quadrado entre os tratamentos para cada meio, por isso os três grupos foram reunidos em apenas um tratamento (T10).

As taxas de maturação nuclear observadas foram semelhantes aquelas reportadas por DODE e ADONA (2001) e ALVES *et al.* (2001), entretanto, esses autores não avaliaram os meios de transporte, somente a taxa de maturação após o cultivo por 24 horas. Dentre as diversas pesquisas que vêm sendo realizadas testando meios de transporte, poucos trabalhos se referem à taxa de maturação nuclear, referindo-se apenas à taxa de clivagem e à produção de embriões. Desse modo, não foi possível uma comparação mais detalhada entre os diferentes estudos.

De acordo com GONÇALVES *et al.* (2007), os baixos resultados da PIV de embriões bovinos (35% na taxa de blastocistos) são advindos de diversos fatores, tais como, o tipo de meio utilizado e o tempo para o transporte dos ovócitos até a chegada no laboratório. Por isso, atribui-se tanta importância à composição do meio de transporte, simulando um ambiente que atenda às necessidades dos ovócitos, visto que, após serem aspirados, eles reassumem a meiose rapidamente.

Nos tratamentos (T4, T5 e T6), adicionou-se o hormônio FSH ao meio Talp-Hepes modificado. O FSH, quando adicionado aos meios de cultivo, proporciona nos ovócitos a ativação da enzima adenilato ciclase que, por sua vez, conduz à síntese de cAMP (MEHLMAN, 2005), que tem papel importante na regulação da maturação (GILCHRIST & THOMPSON, 2007). Dessa forma, altas concentrações de cAMP estimulam a maturação nuclear, contudo, se houver uma exposição contínua de cAMP em altas concentrações, pode ocorrer inibição transitória no reinício da meiose (THOMAS *et al.*, 2004). De acordo com THOMAS *et al.* (2004) e LUCIANO *et al.* (2004), este atraso na quebra da vesícula germinal permite que seja estendida a duração das comunicações entre as células do *cumulus* e o ovócito, por meio das junções *gap*, promovendo uma troca prolongada de metabólitos e outros fatores, melhorando assim a qualidade do ovócito (GILCHRIST e THOMPSON, 2007).

No decorrer do tempo (2, 4 e 8 horas), observou-se que os ovócitos expostos aos meios de transporte expandiram as células do *cumulus*. Para BEVERES *et al.* (1997) e CALDER *et al.* (2003), esta expansão pode estar relacionada ao FSH, já que este hormônio acrescido promove nos meios de transporte a expansão das células do *cumulus*. Isto ocorre pela indução da expressão de muitos fatores essenciais, dentre eles, o ácido hialurônico, que

tem capacidade hidrofílica, promovendo a retenção de água e, conseqüentemente, causando essa expansão (SIRARD *et al.*, 2007). Em seus estudos, CHEN *et al.* (1990) relatam que expansão do *cumulus* é benéfica, tanto na maturação *in vivo*, quanto na *in vitro*, pois facilita a capacitação do espermatozóide, a fertilização e o desenvolvimento embrionário (EYESTORE e BOER, 1993; IZADYAR *et al.*, 1998). Entretanto, vale ressaltar que a simples expansão do *cumulus* durante a MIV não determina, necessariamente, a capacidade de desenvolvimento do ovócito (LONERGAN *et al.*, 1994).

De acordo com ALVES *et al.* (2001), aumentando as concentrações de FSH acima da utilizada no experimento, pode-se atrasar ou inibir o processo de MIV. Em sua pesquisa, foi avaliada a maturação nuclear nas diferentes concentrações (10, 20 e 40 µg/mL de FSH) adicionadas ao meio TCM199 com 25 mM de HEPES, tendo sido verificados 81,8%, 55,5% e 50% de metáfase II, respectivamente. Deste modo, os resultados reportados pelos autores, na concentração de 10 µg/mL de FSH, apresentam-se semelhantes ao do presente estudo, principalmente na percentagem do grupo controle, que não teve influência de outro fator.

Na necessidade de aumentar a taxa de maturação durante o período de exposição, adicionou-se ao meio Talp-HEPES modificado um substrato energético, o piruvato de sódio. Este substrato, segundo RIEGER e LOSKUTOFF (1994), possui taxa de metabolismo 10 vezes maior que os demais substratos, estimulando assim a maturação nuclear dos ovócitos bovinos para o estágio de metáfase II (LIM *et al.*, 1999). Entretanto, STEEVES e GARDNES (1999), em seus estudos, ao comparar as concentrações de 0,33 mM e 6,9 mM de piruvato de sódio, não observaram tal preferência.

Utilizou-se no experimento uma concentração menor do que as citadas pelos autores (0,0454 mM), notando-se que o substrato não influenciou a taxa de maturação nuclear, como nos registros de CÉTICA *et al.* (1999). Isto, no entanto, pode estar relacionado ao fato de, no presente experimento, apenas ovócitos imaturos classificados como *cumulus* compactos e com até três camadas de células do *cumulus* terem sido utilizados. De acordo com RIEGER e LOSKUTOFF (1994), este substrato possui maior importância para a maturação nuclear de ovócitos desnudos. Sabe-se que as células do *cumulus* são importantes para captação, metabolização e conversão de glicose em

piruvato, que, subseqüentemente, se transfere ao ovócito via junções *gap* (BILODEAN-GOESEELS, 2006). Já os ovócitos desnudos não têm essas células, então há necessidade de piruvato para ocorrer a maturação nuclear.

No intuito de melhorar a eficiência do meio de transporte, TWAGIRAMUNGU *et al.* (1998) e FRY *et al.* (2000) acondicionaram ao meio TCM-199 um tampão fosfato, o bicarbonato de sódio. Porém, a necessidade de gaseificação prévia desse meio em estufas de cultivo com atmosfera controlada se apresenta como uma desvantagem, pois ocorre uma variação no pH reduzindo assim os índices de embriões na PIV.

No presente estudo, adicionou-se ao meio TCM modificado o tampão Hepes. Com isso, tentou-se evitar variações de pH do meio, evitando a necessidade de utilizar estufas gaseificadas. Apesar de não ter sido avaliada a taxa de desenvolvimento embrionário neste experimento, os resultados verificados na taxa de maturação nuclear (T7, T8 e T9) foram semelhantes ao controle, apresentando índices dentro do esperado. A concentração de tampão Hepes utilizado foi menor do que os empregados por (25 mM) FRY *et al.* (2000), LEIVAS *et al.* (2002), KURTZ-FILHO *et al.* (2003), ALVES *et al.* (2003) e LEIVAS *et al.* (2004). Esses autores não avaliaram a taxa de maturação nuclear, mas obtiveram taxa de blastocisto em torno de 25%. SCHWARTZ *et al.* (1998), utilizando uma concentração menor (20 mM), registraram uma média de 17% na taxa de blastocisto. Assim, não se pode concluir que, diminuindo a concentração de tampão Hepes, o desenvolvimento embrionário seja diminuído, pois a metodologia empregada nos trabalhos foi diferente.

TWAGIRAMUNGU *et al.* (1998), ao avaliar a eficiência do TCM199 comparado ao TCM199-HEPES no transporte de ovócitos, não observaram diferença na produção de embriões no tempo de seis horas, quando comparado ao grupo controle. Contudo, os ovócitos antes de serem transportados foram incubados por seis horas a 38,5°C. Assim, apesar do sucesso, existe o inconveniente da incubação prévia, que se torna inviável, pois a maioria das propriedades está distante dos laboratórios. Além disso, a utilização de incubadora portátil se torna desfavorável por aumentar o custo da PIV.

Da mesma forma, TESSMANN *et al.* (2004), utilizando-se o meio TCM-Hepes com bicarbonato de sódio por até seis horas em garrafas térmicas a

38,5°C, obtiveram taxas de blastocisto semelhantes aos ovócitos colocados para maturar após aspirados. Assim, pode-se admitir que o sucesso no desenvolvimento embrionário comparado ao grupo maturado imediatamente após aspiração se deve ao fato de estes autores terem colocado os ovócitos em palheta de 0,25 mL. A redução do volume de ar promovido pelo preenchimento da palheta, provavelmente reduz as variações de pH do meio (ALVES *et al.*, 2003). Quando se faz o transporte sem controle da atmosfera gasosa, procura-se minimizar ao máximo as possíveis variações de pH do meio (TESSMANN *et al.*, 2004). Já, no presente experimento, os ovócitos permaneceram em placas de quatro poços - Nunc<sup>®</sup> em temperatura de 38,5°C por até oito horas.

O volume de meio de cultivo e a densidade de ovócitos/embriões utilizados durante o PIV podem ser variáveis (BRUM *et al.*, 2004). Para PALMA *et al.* (1992), o número de ovócitos por quantidade de meio pode influenciar a produção de blastocisto. WARD *et al.* (2000) observaram que o cultivo de ovócitos em grupos proporciona maior taxa de blastocisto do que os cultivados separadamente. No presente experimento, respeitou-se a proporção de aproximadamente um CCO para cada 25 µL de meio. Sabe-se, no entanto, que para a maturação, usualmente são utilizados volumes maiores de meio, provavelmente devido à alta concentração de CCO cultivado simultaneamente (BRUN *et al.*, 2004). Contudo, não há relatos da quantidade de meio por número de ovócitos utilizados para o transporte. BRUM *et al.* (2004), ao avaliar o volume do meio e o número de ovócitos na fecundação *in vitro*, observaram que nem o volume do meio nem o número de ovócitos influenciou a produção de blastocistos e a taxa de eclosão.

O tempo de cultivo, no presente experimento, foi de 24 horas, já que para a avaliação da taxa de maturação nuclear se considerou ovócito maturado aquele que apresentou configuração cromossômica em MII e presença de grupo cromossômico pertencente ao primeiro corpúsculo polar, quando presente. Sabe-se que o estágio de MII ocorre a partir de 18 horas com a eliminação do CP entre 18 a 21 horas. Segundo HYTTEL *et al.* (1989), após seis a sete horas, o CP se degenera, não mais podendo ser observado. Portanto, em um ovócito que elimina o CP com 18 horas de MIV, não se observa sua presença com 24 horas, geralmente o tempo de confecção da

lâmina. Apesar de não ter sido realizada uma classificação para ovócitos em MII com ou sem presença de CP, observou-se que a grande maioria de MII se apresentava com CP nítido após as 24 horas de cultivo.

Entretanto, o período de tempo utilizado desde a aspiração dos ovócitos até a confecção das lâminas permaneceu superior a 24 horas, ou seja, se tivesse ocorrido quebra da vesícula germinal após a aspiração, não seria tão comum encontrar o CP, devido à sua degeneração. Como mencionado anteriormente, o FSH adicionado aos meios de transporte e maturação promove no ovócito a síntese de cAMP, ou seja, a contínua exposição de cAMP em altas concentrações pode promover uma inibição transitória no reinício da meiose (THOMAS *et al.*, 2004). Este fato pode ter ocorrido no presente experimento, já que foi adicionado FSH, tanto no meio Talp-Hepes modificado, como no TCM modificado. Ainda, no meio TCM modificado, utilizou-se em sua constituição o BSA fração V, que, em estudo recente, mostrou retardar a QVG (ALI & SIRARD, 2002). Portanto, no experimento, os ovócitos ficaram expostos aos meios por certo período de tempo antes de ser submetidos ao cultivo por 24 horas, sendo essa forma, fator determinante para o atraso na QVG.

Um dos fatores que podem ter influenciado a não ocorrência de diferença ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos, seria o fato de ter adicionado SVE no meio Talp-Hepes, visto que esse meio não possui ação de bloqueio da maturação nuclear (BEHRENSDORF, 1999), e neste, não foi adicionado o hormônio FSH e nem o BSA fração V. Esta fonte protéica de origem animal tem apresentado bons resultados na maturação de ovócito e no desenvolvimento *in vitro* de embriões (CAROLAN *et al.*, 1995), da mesma forma que a adição de soro fetal bovino ao meio de cultura proporciona um efeito benéfico à maturação nuclear (MINGOTI *et al.*, 1995). Assim, não se observou influência ( $P > 0,05$ ) dos meios propostos na maturação nuclear, porém não foi realizada a avaliação da maturação citoplasmática. Portanto, admite-se que possa ter ocorrido alguma interferência neste processo, pois a capacidade de completar a maturação citoplasmática se desenvolve além da capacidade de completar a maturação nuclear (DODE *et al.*, 2000).

BERTAGNOLLI *et al.* (2004), em seus estudos, relataram que o percentual de embriões que se desenvolvem a partir de ovócitos maturados e

fecundados *in vitro* pode ser inferior àquele obtido *in vivo*, isso acontecendo em decorrência de problemas no processo de maturação citoplasmática, também denominada capacitação ovocitária. Para HYTTEL *et al.* (1989), a maturação citoplasmática *in vitro* de ovócitos bovinos acompanha o mesmo padrão das condições *in vivo*.

A habilidade de o ovócito ser fertilizado depende de uma maturação normal, tanto a nuclear (estádio de metáfase II) quanto a citoplasmática, podendo-se avaliar a maturação nuclear pela configuração cromossômica, na qual ela se encontra, sendo o estágio de metáfase II representativo de maturação nuclear normal. Já a maturação citoplasmática, necessária no desenvolvimento pós-fertilização, dificilmente se avalia, muitas das vezes devido à necessidade de microscopia eletrônica (HINRICHS *et al.*, 1995).

## 5. CONCLUSÕES

A exposição de ovócitos imaturos de bovinos em meios Talp-Hepes, Talp-Hepes modificado e TCM modificado, em temperatura de 38°C e sem controle da atmosfera gasosa por um período de até oito horas, não altera a taxa de maturação nuclear.

A adição de 10 µg/mL do hormônio FSH e 0,0454 mM de Piruvato de Sódio ao meio Talp-Hepes (BAVISTER *et al.*, 1983) não incrementa a taxa de maturação nuclear após a exposição por um período de até oito horas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. **Biology Reproduction**, v.66, p.901-905, 2002.

ALVES, D.F.; RAUBER, L.P.; RUBIN, F.B.; BERNARDI, M.L.; DEZEN, D.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B. *In vitro* embryo development from bovine oocytes maintained in follicular fluid or TCM-Hepes. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.279-286, 2003.

ALVES, J.D.R.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F.; CALDAS, J.G.L.; SANTOS FILHO, A.S.; BARRETO, M.B. Altas concentrações de FSH-p na maturação *in vitro* de oócitos de *Bos indicus*. **Ciência Rural**, v.31, n.4, p.645-649, 2001.

BAVISTER, B.D.; BALL, G.D.; LEIBFRIED, M.L.; LENZ, R.; AX, R.L.; FIRST, N.L. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. **Biology Reproduction**, v. 28, p.717-725, 1983.

BEHRENSDORF, L.C. **Fluido folicular bovino para manutenção e transporte de ovócitos imaturos**. Rio de Janeiro, 1999. p.35. Dissertação (Mestrado), Instituto de Veterinária - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1999.

BERTAGNOLLI, A.C.; GONÇALVES, P.B.D.; GIOMETTI, I.C.; COSTA, L.F.S.; OLIVEIRA, J.F.C.; GONÇALVES, I.D.V.; BARRETO, K.P.; EMANUELLI, I.P.; BORGES L.F.K. Interação entre células do *cumulus* e atividade da proteína quinase C em diferentes fases da maturação nuclear de oócitos bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p.488-496, 2004.

BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; VAN DEN HURK, R.; IZADYAR, F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v.47, p.13-22, 1997.

BILODEAU-GOESEELS, S. Effects of culture media and energy sources on the inhibition of nuclear maturation in bovine oocytes. **Theriogenology**, v.66, p.297-306, 2006.

BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.41, p.54-62, 1995.

BOONE, W.R.; SHAPIRO, S.S. Quality control in the *in vitro* fertilization laboratory. **Theriogenology**, v.33, p.23-50, 1990.

BRUM, D.S.; LEIVAS, F.G.; NOEBAUER, M.R.; BERNARDI, M.L.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B. Volume de meio e número de oócitos para fecundação na produção *in vitro* de embriões bovinos. **Archives of Veterinary Science**, v.9, p. 61-66, 2004.

CALDER, M.D.; CAVENEY, A.N.; SMITH, L.C.; WATSON, A.J. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation *in vitro*. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.11, p.1-14, 2003.

CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; VALE FILHO, V.R. Developmental competence of oocytes from prepubertal *Bos indicus* crossbred cattle. **Animal Reproduction Science**, v.85, p.53-59, 2006.

CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; MONGET, P.; MONNIAUX, D.; MERMILLOD, P. Effect of follicle size and quality on the ability of follicular fluid to support cytoplasmic maturation of bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.43, p.477-483, 1996.

CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; VAN-LANGENDONCKT, A.; MERMILLOD, P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Theriogenology**, v.43, p.1115-1128, 1995.

CASTILHO, C.; GARCIA, J.M. Divergência no crescimento folicular: efeito na competência oocitária para produção *in vitro* de embriões – revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 3, p. 17-23, 2005.

CETICA, P.D.; PINTOS, L.N.; DALVIT, G.C.; BECONI, M.T. Effect of lactate dehydrogenase activity and isoenzyme localization in bovine oocytes and utilization of oxidative substrates on *in vitro* maturation. **Theriogenology**, v.51, p.541-550, 1999.

CHEN, L.; WERT, S.E.; HENDRIX, E.M.; RUSSELL, P.T.; CANNON, M.; LARSEN, W.J. Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the *cumulus* mass. **Molecular Reproduction and Development**, v.26, p.236-247, 1990.

CORDEIRO, M. S.; Silva, E. H. S.; MIRANDA, M. S.; BIONDI, F. C.; SANTOS, S. S. D.; OHASHI, O. M. The use of coconut water solution (*Cocos nucifera*) as a holding medium for immature bovine oocytes for *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction**, v. 3, p.376-379, 2006.

COSTA, E. P. **Aspectos morfológicos (citológicos e ultra-estruturais) e desenvolvimento de ovócitos de bovinos “*in vitro*”**. Belo Horizonte, 1994.

p.155. Tese (Doutorado em Ciência Animal, área Reprodução Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, 1994.

COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C.; SÁ, W.F.; COSTA, A.H. Tipos morfológicos de ovócitos de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, p.417-424, 1997a.

COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C.; SÁ, W.F.; COSTA, A.H. Técnicas para desnudamento rápido de ovócitos de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, p.425-432, 1997b.

COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C.; SÁ, W.F.; COSTA, A.H. Técnica para a avaliação do estágio de maturação “*in vitro*” de ovócitos bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, p.433-440, 1997c.

CROZET, N.; AHMED-ALI, M.; BUDOS, M.P. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.103, p.293–298, 1995.

DODE, M.A.N.; ADONA, P.R. Developmental capacity of *Bos indicus* oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6-dimethylaminopurine. **Animal Reproduction Science**, v.65, p.171-180, 2001.

DODE, M.A.N.; RODOVALHO, N.C.; UENO, V.G.; ALVES, R.G.O. Efeito do tamanho do folículo na maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos de fêmeas zebuínas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.1, p. 207-214, 2000.

DONNAY, I.; FAERGE, I.; GRONDAHL, C.; VERHAEGHE, B.; SAYOUD, H.; PONDERATO, N.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Effect of prematuration, meiosis activating sterol and enriched maturation medium on the nuclear maturation and competence to development of calf oocytes. **Theriogenology**, v.62, p.1093–1107, 2004.

DURANTHON, V.; RENARD, J.P. The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. **Theriogenology**, v.55, p.1277-1289, 2001.

DUROCHER, J.; MORIN, N.; BLONDIN, P. Effect of hormonal stimulation on bovine follicular response and oocyte developmental competence in a commercial operation. **Theriogenology**, v.65, p.102-115, 2006.

EYESTONE, W. H.; BOER, H. A FSH enhances developmental potential of ovine oocytes matured in chemically defined medium. **Theriogenology**, v.39, p.216, 1993.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development**, v.42, p.437-442, 1995.

FERRAZ, M.L.; DAYAN, A.; WATANABE, M.R.; WATANABE, Y.F. Influência da frequência da OPU-FIV de bovinos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.28, p. 251, 2000.

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais – Moifopa. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. 64 **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo (Brasil): Livraria Varela. p.227-260, 2002.

FRY, R. C.; KELLY, J.M.; HARRIS, S.G.; EAR, C.R. No difference in embryo production from oocytes collected by ovum pick-up from commercial cows when using either hepes or bicarbonate-buffered IVM media. **Theriogenology**, v.53, p.353, 2000.

GANDOLFI, F.; LUCIANO, A.M. MODINA,S.;PONZINI, A.; POCAR,P.; ARMSTRONG, D.T.; LAURIA, A. The *in vitro* developmental competence of bovine oocytes can be related to the morphology of the ovary. **Theriogenology**, v.48, p.1153-1160, 1997.

GARCIA, J. M.; ESPER, C.R.; AVELINO, K.B.; SENEDA, M.M.; DAYAN, A.; RODRIGUES, C.F.M.; PELKER, R.Z. Produção *in vitro* de embriões bovinos: diferentes procedimentos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.26, p. 280-281, 1998.

GIBBONS, J.R.; BEAL, W.E.; KRISHER, R.L.; FABER, E.G.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C. Effect of once versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. **Theriogenology**, v.42, p.405-419, 1994.

GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. **Theriogenology**, v.67, p.6-15, 2007.

GONÇALVES, P.B.D.; BARRETA, M.H.; SANDRI, L.R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A.Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.212-217, 2007.

GONÇALVES, P.B.D., VISINTIN, J.A., OLIVEIRA, M.A.L., MONTAGNER, M.M., COSTA, L.F.S. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P.B.D., FIGUEIREDO, J.R. e FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo (Brasil): Livraria Varela. p.195-226, 2002.

GOODHAND, K.L.; WATT, R.G.; STAINES, M.E.; HUTCHINSON, J.S.; BROADBENT, P.J. *In vivo* oocytes recovery and *in vitro* embryo production

from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenology**, v.51, p.951-961, 1999.

GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. **Cambridge**: Cambridge University Press, p.30-142, 1994.

GREVE, T.; CALLESEN, H.; HYTTEL, P.; HOIER, R.; ASSEY, R. The effect of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. **Theriogenology**, v.43, p.41-50, 1995.

HAGEMANN, L.J. Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. **Theriogenology**, v.51, p.449-459, 1999.

HENDRIKSEN, P.J.M.; VOS, P.L.A.M.; STEENWENG, W.N.M.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. **Theriogenology**, v.53, p.11-20, 2000.

HENDRIKSEN, P.J.M.; STEENWEG, W.N.M.; HARKEMA, J.C.; MERTON, J.S.; BEVERS, M.M.; VOS, P.L.A.M. Effect of different stages of the follicular wave on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.61, p.909-920, 2004.

HINRICHS, K.; MARTIN, M.G.; SCHMIDT, A.L.; FRIEDMAN, P.P. Effect of follicular components on meiotic arrest and resumption in horse oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.104, p.149-156, 1995.

HURTT, A.E.; LANDIM-ALVARENGA, F.; SEIDEL, G.E.; SQUIRES, E.L. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. **Theriogenology**, v.54, p.119-128, 2000.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23-32, 1997.

HYTTEL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, p.35-47, 1989.

IZADYAR, F.; ZEINSTRA, E.; BEVERS, M.M. Follicle-stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, p.339-345, 1998.

KIM, K.S.; MITSUMIZO, N.; FUJITA, K.; UTSUMI, K. The effects of follicular fluid on *in vitro* maturation, oocytes fertilization on the developmental of bovine embryos. **Theriogenology**, v.45, p.787-799, 1996.

KRISHER, R.L.; BRAD, A.M.; HERRICK, J.R.; SPARMAN, M.L.; SWAIN, J.E. A comparative analysis of metabolism and viability in porcine oocytes during *in vitro* maturation. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.72-96, 2007.

KRUIP, T.H.A.M.; BEVERS, M.M.; KEMP, B. Environment of oocyte and embryo determines health of IVP offspring. **Theriogenology**, v. 53, p. 611-618, 2000.

KURTZ FILHO, M.; RUBIN, M.I.B.; SILVA, C.A.M.; RAUBER, L.P.; ALVES, D.F.; SÁ FILHO, M.F.; SILVA, J.H.S. *In vitro* production of bovine embryo in tubes without gaseous atmosphere control. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.209-216, 2003.

LAWRENCE, T.S.; BEERS, W.H.; GILULA, N.B. Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication. **Nature**, p.272-501, 1978.

LEHMKUHL, R. C.; MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A.D.; PINTO, M.G.L.; FAVA, R. C.; SOARES, M.P.; TALER NETO, A.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B. Desenvolvimento de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular e submetidos à FIV. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 28, p. 276, 2000.

LEIVAS, F. G.; BRUM, D.S.; FIALHO, S.S.; FILHO, M.F.S.; BERNARDI, M.L.; RUBIN, M.I.B.; SILVA, C.A.M. Transport of bovine oocytes in TCM-HEPES maturation medium without controlled atmosphere. **Theriogenology**, v. 57, p. 726, 2002.

LEIVAS, F.G.; BRUM, D.S.; MEZZALIRA, A.; PILLA, F.C.; BERNARDI, M.L.; RUBIN, M.I.B.; SILVA, C.A.M. Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação sem controle da atmosfera gasosa. **Ciência Rural**, v.34, p.219-224, 2004.

LEIVAS, F.G.; BRUM, D.S.; POZZOBON, S.; FIGUEIRÓ, G.M.; FULBER, M.; BERNARDI, M.L.; RUBIN, M.I.B.; SILVA, C.A.M. Desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos mantidos em meio de maturação não gaseificado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.1, p.414-415, 2001.

LIM, J.M.; LEE, B.C.; LEE, E.S.; CHUNG, H.M.; KO, J.J.; PARK, S.E.; CHA, K.Y.; HWANG, W.S. *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes cultured in a chemically defined, protein-free medium: effects of carbohydrates and amino acids. **Reproduction Fertility and Development**, v.11, p.127-132, 1999.

LONERGAN, P.; FAIR, T. *In vitro*-produced bovine embryos - Dealing with the warts. **Theriogenology**, v. 68, p. 17-22, 2008.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND M.P.; GORDON I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v.37, p.48-53, 1994.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND M.P. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v.41, p.427-437, 2001.

LUCIANO, A.M.; MODINA, S.; VASSENA, R.; MILANESI, E.; LAURIA, A.; GANDOLFI, F. Role of intracellular cyclic adenosine 30,50- monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during *in vitro* maturation of bovine oocyte. **Biology Reproduction**, v. 70, p.465-472, 2004.

MACHATKOVÁ, M.; JOKESOVÁ, E.; PETELÍKOVÁ, J.; DVORACEK, V. Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. **Theriogenology**, v.45, p.801-810, 1996.

MACHATKOVA, M.; KRAUSOVA, K.; JOKESOVA, E.; TOMANEK, M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v.61, p.329-335, 2004.

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

MEHLMANN, L.M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction**, v.130, p.791-799, 2005.

MERMILLOD, P.; TOMANEK, M.; MARCHAL, R.; MEIJER, L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. **Molecular Reproduction and Development**, v.55, n.1, p.89-95, 2000.

MINGOTI, G.Z.; GARCIA, J.M.; ROSA-E-SILVA, A.A.M. The effect of serum on *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and esteroidogenesis of bovine oocytes co-cultured with granulosa cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.28, p.213-218, 1995.

MIRANDA, M.S.; CARVALHO, C.M.F.; CORDEIRO, M.S.; SANTOS, S.S.D; OHASH, O.M. Sistemas alternativos de incubação e meios de cultivo para produção *in vitro* de embrião bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.218-223, 2007.

MONTAGNER, M.M.; GONÇALVES, P.B.D.; NEVES, J.P.; COSTA, L.F.S.; BORTOLOTTI, E.B.; FARIAS, A.M.; STRANIERI, P. HEPES na produção de embriões bovinos *in vitro*. **Ciência Rural**, v.30, p.469-474, 2000.

MOORE, K.; RODRIGUEZ-SALLABERRY, C.J.; KRAMER, J.M.; JOHNSON, S.; WROCLAWSKA, E.; GOICOA, S.; NIASARI-NASLAJI, A. *In vitro* production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: Effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. **Theriogenology**, v.68, p.1316-1325, 2007.

PALMA, G.A.; CLEMENT-SENGEWALD, A.; BERG, U.; BREM, G. Role of the embryo number in the development of *in vitro* produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.37, p.271, 1992.

PAVLOK, A.; LUCANS-HAHN; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v.31, p.63-67, 1992.

PEIXER, M.A.S.; SOUZA, R.V.; RUMPF, R.; DE BEM, A.R.; NETO, M.A.P. Nascimento dos primeiros produtos de FIV da raça Nelore no Cenargem. **Zootecnia**, v. 32, p. 49, 1995.

PINTO, M.G.L.; ALVES, D.F.; RAUBER, L.P.; SÁ FILHO, M.F.; MEZZALIRA, A.; BERNARDI, M.L.; SILVA C.A.M.; RUBIN, M.I.B. Holding bovine oocytes on equine follicular fluid for IVP. **Theriogenology**, v.57, p.736, 2002.

RAMOS, A.A.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; HENRY, M.R.J.M. Protocolos de produção *in vitro* de embriões na raça Gir. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v.58, n.3, p.341-347, 2006.

REVEL, F.; MERMILLOD, P.; PEYNOT, N.; RENARD, J.P.; HEYMAN, Y. Low developmental capacity of *in vitro* matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.103, p.115–20, 1995.

RIEGER, D.; LOSKUTOFF, N. Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.100, p.257-260, 1994.

ROTH, Z.; ARAV, A.; BRAW-TAL, R.; BOR, A.; WOLFENSON, D. Effect of treatment with follicle-stimulating hormone or bovine somatotropin on the quality of oocytes aspirated in the autumn from previously heat-stressed cows. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.1398-1405, 2002.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002, 265p.

SCHERTHNER, W.; WENIGERKIND, H.; BOXHAMMER, K.; JUNG, P.; STOJKOVIC, M.; WOLF. Storage of bovine oocytes after ultrasound guided follicle aspiration: Effects on developmental competence. In: REUNION A.E.T.E., 14e., 1998, Venise. **Proceedings...** Venise : A.E.T.E., 1998. p.242.

SCHWARTZ, J.; SCHNEIDER., M.R.; RODRIGUES, J.L.; REICHENBACH, H-D. Effect of short-term storage of bovine oocytes in different media and temperatures on the subsequent *in vitro* embryo development. **Theriogenology**, v.49, n.1, p.217, 1998.

- SENEDA, M. M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; OLIVEIRA, J.A.D.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v.67, p.37-43, 2001.
- SIRARD, M. A.; BILODEAU, S. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 777-783, 1990.
- SIRARD, M.A.; DESROSIER, S.; ASSIDI, M. *In vivo* and *in vitro* effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. **Theriogenology**, v.68, p. 71-76, 2007.
- STEEVES, T.E.; GARDNER, D.K. Metabolism of glucose, pyruvate and glutamine during the maturation of oocytes derived from prepubertal and adult cows. **Molecular Reproduction and Development**, v.54, p.92-101, 1999.
- STRINGFELLOW, D.A.; RIDDELL, K.P.; GALIK, P.K.; DAMIANI, P.; BISHOP, M.D.; WRIGHT, J.C. Quality controls for bovine viral diarrhoea virus-free IVF embryos. **Theriogenology**, v.53, p.827-839, 2000.
- SÜSS, U.; WÜTHRICH, K.; STRANZINGER, G. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.38, p.871-880, 1988.
- TANGHE, S.; SOOM, A.V.; MEHRZAD, J.; MAES, D.; DUCHATEAU, L.; KRUIF, A. Cumulus contributions during bovine fertilization *in vitro*. **Theriogenology**, v.60, p.135-149, 2003.
- TESSMANN, J.V.; MOZZAQUATRO, L.P.R.; SANTOS, M.V.; CHEQUIM, R.M.; BERNARDI, M.L.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B. Transporte-maturação de oócitos bovinos em palhetas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.177-184, 2004.
- THOMAS, R.E.; ARMSTRONG, D.T.; GILCHRIST, R.B. Bovine cumulus oocyte gap junctional communication during *in vitro* maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate levels. **Biology of Reproduction**, v. 70, p.548-556, 2004.
- TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; GUILBAULT, L.A.; SIRARD, M.A.; BOUSQUET, D. Media and time of oocytes transport influence their developmental competence for *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 49, p. 299, 1998.
- VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões no Brasil: uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, p.915-924, 2007.
- WARD, F.A.; Lonergan, P.; Enright, B.P.; Boland, M.P. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production *in vitro* using ovum pick-up technology. **Theriogenology**, v.54, p.433-446, 2000.