

RAFAEL JOSÉ OTERO ARROYO

**CLASSIFICAÇÃO DE OVOCITOS IMATUROS DE BOVINOS PELA UTILIZAÇÃO
DO AZUL CRESIL BRILHANTE.**

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**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

O87c
2008

Otero Arroyo, Rafael José, 1981-

Classificação de ovocitos imaturos de bovinos pela
utilização do azul cresil brilhante / Rafael José Otero
Arroyo. – Viçosa, MG, 2008.

xii, 31f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Eduardo Paulino da Costa.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 25-31.

1. Bovino - Reprodução. 2. Fertilização in vitro.
3. Reprodução animal. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22.ed. 636.20824

RAFAEL JOSÉ OTERO ARROYO

**CLASSIFICAÇÃO DE OVÓCITOS IMATUROS DE BOVINOS PELA
UTILIZAÇÃO DO AZUL CRESIL BRILHANTE**

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: 21 de julho de 2008

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

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

Prof. José Domingos Guimarães

Prof. Orlando Marcelo Vendramini

Prof. Eduardo Paulino da Costa
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus Pai, por permitir-me alcançar as metas traçadas em minha vida, já que é ele o único que ilumina meu caminho e me dá forças para superar qualquer obstáculo interposto em meu trajeto.

Aos meus pais, Rafael e Maria T. pelo grande apoio, pelo incentivo aos estudos, por fazer-me compreender que o melhor que pode ter um homem é a educação, pelos conselhos recebidos que me enchem de valor nos momentos difíceis, os agradeço por ensinar-me a trilhar o caminho da vida.

Aos meus irmãos Jader e Tânia, por ajudarem-me a tornar possível à realização dos meus sonhos, pela amizade, conselhos. Meu irmão Jader por ter me ajudado a obter este título, pois foi quem me incentivou estudar no Brasil.

Ao meu orientador, Professor Eduardo Paulino da Costa, pela oportunidade de ter sido meu orientador, por ter acreditado em mim, pela orientação, ensinamentos, conselhos profissionais e conselhos de vida, estimável amizade, ajuda e confiança. Muito obrigado Professor Eduardo!

Aos meus amigos de mestrado Giancarlo e Jose Rogério, pois foram as primeiras pessoas que me brindaram sua amizade pessoal, por serem como meus irmãos, pelo apoio, ensinamentos, auxílio, solidariedade e paciência nos momentos difíceis da vida, da qual levarei lembranças por toda minha vida.

Aos meus amigos Mastoby, Professor Joaquim Patarroyo e Professora Marlene, pela amizade, atenção, gentileza e pelo acolhimento.

Aos meus amigos Gustavo, Flavio, Sanely, Emilio, pelo completo apoio, ajuda, amizade e compreensão nos momentos difícil em Viçosa.

Ao meu amigo Gustavo Bruno Mota, pela amizade, auxílio e por ter sido base fundamental para a conclusão deste projeto.

A Rose, pela amizade, atenção, e pelo grande auxílio desde que cheguei a Viçosa.

Ao senhor Nenzinho, por tornar o dia- a- dia no laboratório muito fácil, alegre e agradável.

Aos meus amigos, colegas de republica, Felipe, Caio, Diogo, pela amizade, convivência agradável e pelo companheirismo.

A UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brasil, por fazer me sentir como em minha Casa, pelos melhores momentos de Minha Vida. Muito Obrigado a TODOS.

MUCHAS GRACIAS

“COLOMBIA”

*A vida é uma batalha da qual sai
vencedor aquele que luta e procura
alcaçar os sonhos e as coisas que
almeja.*

Rafael Jose Otero Arroyo

BIOGRAFIA

RAFAEL JOSÉ OTERO ARROYO, filho de Rafael José Otero Vergara e Maria Teresa Arroyo de Otero, nasceu em 13 de Março de 1981, em Montería – Córdoba- Colômbia.

Em 26 de Março de 2004, graduou-se em Medicina Veterinária e Zootecnia pela Universidade de Córdoba- Colômbia.

Em 25 de Fevereiro de 2005, graduou-se em Especialista em Reprodução Bovina Tropical e Transferência de Embriões pela Universidade de Ciências Aplicadas e Ambientais U.D.C.A – Bogotá – Colômbia.

Em 09 de Outubro de 2006, iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal, no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Minas Gerais.

ÍNDICE

<u>LISTAS DE TABELAS.....</u>	vii
<u>LISTAS DE FIGURAS.....</u>	viii
<u>RESUMO.....</u>	ix
<u>ABSTRACT.....</u>	xi
<u>1. INTRODUÇÃO.....</u>	1
<u>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</u>	3
<u>2.1. Oogênese e Foliculogênese.....</u>	3
<u>2.2. Metabolismo de CCOs.....</u>	5
<u>2.3. Transporte de CCOs após OPU.....</u>	7
<u>2.4. Seleção de CCOs por Azul Cresil Brillhante.....</u>	9
<u>2.5. Maturação <i>in vitro</i> de ovócitos.....</u>	12
<u>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</u>	14
<u>3.1. Coleta dos ovários e manipulação dos ovócitos.....</u>	14
<u>3.2. Delineamento experimental.....</u>	15
<u>3.3. Coloração dos CCOs por ACB.....</u>	15
<u>3.4. Maturação "<i>in vitro</i>" de ovócitos após a exposição à diferentes meios e tempo de manutenção.....</u>	16
<u>3.5. Avaliação da taxa de maturação nuclear "<i>in vitro</i>".....</u>	16
<u>3.6. Análise estatística.....</u>	16
<u>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</u>	17
<u>4.1 Taxas de coloração por ACB.....</u>	17
<u>4.2- Taxas de maturação nuclear.....</u>	19
<u>5. CONCLUSÕES.....</u>	24
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u>	25

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Taxa de coloração de ovócitos expostos ao corante ACB por 60 min imediatamente após seleção morfológica ou após cinco horas de manutenção em Talp Hapes	18
Tabela 2 - Maturação nuclear in vitro de ovócitos ACB+ e ACB- selecionados após exposição imediata ao corante ou após cinco horas de manutenção em Talp Hapes	20

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Ovócitos que foram expostos 60 min ao ACB.....	23
--	----

RESUMO

ARROYO, Rafael José Otero, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2008. **Classificação de ovócitos imaturos de bovinos pela utilização do azul cresil brilhante.** Orientador: Eduardo Paulino da Costa. Co-orientadores: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula, Carlos Antônio de Carvalho Fernandes, Jeferson Ferreira da Fonseca e João Henrique Moreira Viana.

A competência dos complexos *cumulus* ovócito (CCOs) selecionados para os sistemas de maturação *in vitro* (MIV) está diretamente relacionada ao sucesso da biotécnica de produção *in vitro* de embriões. Por tal razão, associado à seleção morfológica, o método de seleção de ovócitos através da coloração por Azul Cresil Brilhante (ACB) tem sido amplamente testado e surge como ferramenta adicional de seleção ovocitária. Também a manutenção por várias horas dos CCOs em meios específicos, logo após aspiração dos folículos ovarianos, pode comprometer o qualidade dos CCOs devido a alterações de pH, oscilações de temperatura e ao próprio meio utilizado. O presente experimento teve por objetivo investigar a competência de maturação nuclear *in vitro* dos ovócitos corados (ACB+) e incolores (ACB-) após manutenção por 5 horas em Talp Hepes. Após seleção dos ovócitos por ACB, cinco tratamentos experimentais foram submetidos a MIV. No T1 (testemunha), os ovócitos foram maturados *in vitro* imediatamente após a manipulação. Posteriormente ao tempo de exposição em ACB (1h) após 5 ou 0 horas em Talp Hepes, os ovócitos foram separados em corados zero hora (T2), não corados zero hora (T3), corados cinco horas (T4) e não corados cinco horas (T5) e submetidos à maturação *in vitro*. Houve diferença entre os tratamentos quanto ao percentual de ovócitos que apresentaram configuração nuclear de metáfase I (MI) ao término da MIV. Os tratamentos T1 e T4 foram semelhantes ($p>0,05$). O T2 foi semelhante ($p>0,05$) ao T4, mas inferior ($p<0,05$) ao T1. O T3 e T5 foram semelhantes ($p>0,05$) porém apresentaram maior ($p<0,05$) percentual de ovócitos em MI do que T1, T2 e T4. Quanto a capacidade dos ovócitos em completarem a maturação nuclear *in vitro* (atingirem a MII), observou-se que os tratamentos T1, T2, T4 foram semelhantes ($p>0,05$) entre si mas

apresentaram maior ($p < 0,05$) percentual de ovócitos em MII do que o T3 e T5 os quais foram semelhantes. Do total de ovócitos submetidos a MIV, aqueles do T1 apresentaram menor percentual de degenerados do que o T2, T3, T4, T5, os quais demonstraram semelhante percentual de ovócitos degenerados. Em conclusão, a capacidade de coloração de oócitos por ACB não se altera após manutenção dos CCOs por 5 horas em meio Talp HEPES. A competência de oócitos ACB+ em atingir o estágio de MII é maior que oócitos ACB-, mesmo após 5h de manutenção dos CCOs em meio Talp HEPES.

ABSTRACT

ARROYO, Rafael José Otero, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2008. **Immature bovine oocytes classification by the use of Brilliant Cresyl Blue.** Adviser : Eduardo Paulino da Costa. Co-advisers: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula, Carlos Antônio de Carvalho Fernandes, Jeferson Ferreira da Fonseca and João Henrique Moreira Viana.

The competency of the cumulus-oocyte complex (COC) selected to the *in vitro* maturation systems (MIV) is directly related to the biotechnical success of embryo *in vitro* production. Because of that, associated to the morphological selection, the oocyte selection method of Brilliant Cresyl Blue (ACB) has been widely testes and appears as an additional tool to oocytary selection. The maintenance of the COC in specific media for the several hours right after the ovarian follicles can compromise the COC quality due to pH alterations, to temperature oscillations and even to the media used. The objective of this experiment was to investigate the *in vitro* nuclear maturation of stained (ACB+) and non-stained (ACB-) oocytes after kept for 5 hours in Talp Hepes. After the oocytes selection by ACB, five experimental treatments were submitted to MIV. At T1 (control), the oocytes were matures *in vitro* immediately after the manipulation. After the exposition time in ACB (1h) and 5 or 0 hours in Talp Hepes, the oocytes were separated in zero-hour stained (T2), zero-hour non-stained (T3), five-hour stained (T4) and five-hour (T5) and submitted *in vitro* maturation. There where differences between the treatments about the oocyte percentage that presented MI nuclear configuration after MIV. The T1 and T4 treatments were similar ($p>0,05$). The T3 and T5 treatments were equal, but presented higher MI oocyte percentage than T1, T2 and T4 ($p<0,05$). About the oocyte capacity to complete the *in vitro* nuclear maturation (get MII), we observed that the treatment T1, T2 and T4 were similar, ($p>0,05$), but presented higher MII oocyte percentage then T3 and T5, the similar ones. Of all the oocytes submitted to MIV, T1 presented lower percentage of degenerated than T2, T3, T4 and T5, the

ones that showed similar percentage of degenerated oocytes. Concluding, the oocyte staining capacity by ACB doesn't change after keeping the COCs for 5 hours in Talp Hepes media. The ACB+ oocyte competence to get MII stage is higher than ACB-, even after keeping the COCs in Talp Hepes media.

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) pode ser considerada a terceira biotécnica reprodutiva de grande impacto nos sistemas de criação de animais de produção. Posterior a inseminação artificial (IA) e a transferência de embriões (TE), a PIV vem sendo amplamente empregada em animais da espécie bovina. O primeiro registro de nascimento de um bezerro oriundo de embrião produzido totalmente *in vitro*, data de 1987 (GOTO *et al.*, 1988). Deste período até os dias atuais, avanços significativos foram obtidos de maneira que a técnica pôde ser executada além do campo acadêmico e científico. Prova disto é o número crescente de embriões produzidos *in vitro* que são transferidos ao longo dos anos. Dados divulgados em 2006, disponibilizados pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), registram que no ano de 2005, quase 266.000 embriões PIV foram transferidos ao redor do mundo. O Brasil aparece como o país que transfere 48,6% dos embriões produzidos *in vitro* no mundo. Em conjunto, a Coréia e a Republica Popular da China também merecem destaque apresentando próximo de 48% do total (THIBIER, 2006).

Esta técnica tem causado impacto nos sistemas de criação animal, a partir da diminuição do intervalo de gerações e maior número de produtos obtidos de animais geneticamente superiores. Outro aspecto importante é que esta técnica constitui ferramenta indispensável na busca por maior conhecimento dos gametas feminino e masculino, assim como das etapas iniciais do desenvolvimento embrionário. Assim sendo, outras biotécnicas mais recentes como a transferência nuclear de células somáticas (TNCS) a injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) e a transgenia, seriam consideravelmente beneficiadas.

Com o advento da aspiração folicular guiada por ultra-som (OPU-Ovum Pick Up) foi possível obter complexos *cumulus* ovócitos (CCOs) a partir de receptoras vivas, fato este que impulsionou definitivamente a PIV. Entretanto, um dos desafios após a OPU é o transporte dos CCOs da propriedade onde se

encontra a doadora até o laboratório. Sabe-se que o meio utilizado, assim como o pH e a temperatura do mesmo influenciam os resultados de produção de embriões (TWAGIRAMUNGU *et al.*, 1998; SCHWARTZ *et al.*, 1998; LEIVAS *et al.*, 2004).

Outra variável que interfere na PIV é a qualidade dos ovócitos selecionados para a maturação *in vitro*. Apesar dos CCOs com citoplasma homogêneo e mais de três camadas de células do *cumulus* compactas apresentarem melhores resultados de produção de blastocistos *in vitro* (YUAN *et al.* 2005), somente métodos invasivos são capazes de predizer a real competência dos ovócitos (HYTTEL *et al.*, 1997). Neste contexto, o corante Azul Cresil Brilhante (ACB) tem sido empregado logo após seleção morfológica dos CCOs como alternativa a métodos invasivos de avaliação da qualidade dos ovócitos (ALM *et al.*, 2005). O princípio se baseia no fato do ACB ser degradado pela enzima Glicose-6 fosfato desidrogenase (G6PDH) e esta se encontra em menor atividade em ovócitos que atingem seu crescimento final (TSUTSUMI *et al.*, 1992). Estes ovócitos (ACB+) têm demonstrado maior competência que aqueles incolores, os quais apresentam maior atividade de G6PDH (ACB-) (PUJOL *et al.*, 2004; OPIELA *et al.*, 2008; ALM *et al.*, 2005; MOTA, 2008).

O objetivo deste trabalho foi verificar a eficácia do teste ACB na avaliação de ovócitos bovinos imaturos, mantidos por zero ou cinco horas em Talp Hepes, sob condições similares ao transporte após a OPU, avaliados pela taxa de maturação nuclear *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Oogênese e Foliculogênese

Entende-se por oogênese o processo de formação do gameta feminino que se inicia na etapa de gastrulação embrionária. Segundo VAN DEN HURK e ZAO, (2005) o processo de formação dos ovócitos inclui inicialmente a etapa de geração das células germinativas primordiais (CGPs) a partir das células do epiblasto. As CGPs, migram para as gônadas em formação, se proliferam por mitose, quando em seguida se diferenciam em oogônias. Estas últimas entram em divisão meiótica, tornando-se ovócitos. Os ovócitos por sua vez iniciam a meiose que progride até a fase de diplóteno da prófase da primeira divisão meiótica (PI) quando o ciclo celular é interrompido (HAFEZ, 2004). Diniz *et al.* (2005) encontraram oogônias nas gônadas de fetos bovinos de aproximadamente 50 dias de gestação (DG). Já próximo aos 85 DG, foram observados ovócito em divisão meiótica contornado por células foliculares, iniciando a formação dos folículos primordiais.

Ao longo do desenvolvimento do ovócito, destaca-se seu papel crucial na proliferação e diferenciação das células da granulosa ao seu redor. Atualmente, grande atenção tem sido voltada para o fator de crescimento diferencial - 9 (GDF-9) e a proteína morfogenética óssea - 15 (BMP-15). Produzidos pelos ovócitos, esses fatores, de ação parácrina, estimulam a proliferação das células da granulosa assim como indícios demonstram regulação das funções das mesmas (BURATINI *et al.*, 2007). Os ovócitos, nas suas etapas iniciais de desenvolvimento, também sintetizam e armazenam RNAs e proteínas que serão de grande importância para as etapas iniciais do desenvolvimento embrionário (FAIR *et al.*, 2007).

Quando os ovócitos atingem a PI ele já se encontra envolto por uma camada simples de células da granulosa (CGs) achatadas e algumas tendendo a

forma cuboidal, caracterizando o folículo primordial. Em seguida, os folículos classificados como primários, caracterizam-se por maior número de organelas como mitocôndrias, complexos de Golgi e retículos endoplasmático e circundados por uma camada simples de CGs predominantemente cuboidais. Já o folículo secundário é circundado por mais de uma camada de CGs e evidencia-se a formação da zona pelúcida (ZP) e das *gap junctions* entre o ovócito e as células da granulosa (BASSO e ESPER, 2002; HYTTEL *et al.*, 1997). As junções do tipo gap merecem destaque, pois estas permitem a passagem de moléculas de baixo peso molecular proporcionando comunicação bidirecional entre as células da granulosa e a membrana do ovócito (SENBON *et al.*, 2003).

À medida que o folículo cresce, juntamente com o ovócito que permanece com a meiose bloqueada, surge uma cavidade folicular repleta de fluido denominada antro. Nessa fase de folículo terciário, na espécie bovina, o folículo e o ovócito atingem cerca de 3 mm e 80µm de diâmetro, respectivamente. O folículo terciário e o ovócito continuam crescendo atingindo um diâmetro próximo à ovulação de cerca de 15 mm e 120 µm, respectivamente (HYTTEL *et al.*, 1997). O diâmetro do folículo pré-ovulatório é variável entre espécies. Em bovinos, suínos, eqüinos e ovinos este diâmetro pode variar entre 15-20 mm, 6-7 mm, 35-50 mm e 8-10 mm, respectivamente (VAN DEN HURK e ZAO, 2005). Segundo OTOI *et al.* (1997) é evidente a relação entre o diâmetro do ovócito e sua competência quando à maturação meiótica e a produção *in vitro* de embriões. Apesar da capacidade para completar a meiose ser adquirida em ovócitos de cerca de 115 µm de diâmetro, maiores taxas de blastocisto PIV são verificadas a partir de ovócitos entre 120-130 µm. Da mesma forma, o diâmetro dos folículos está diretamente relacionado à competência oocitária (HENDRISKEN *et al.*, 2000).

Diferente dos folículos pré-antrais que parecem depender de uma ação meramente permissiva ao desenvolvimento pelos hormônios gonadotróficos (BURATINI, 2007) o desenvolvimento folicular antral é criticamente dependente de gonadotrofinas. Os folículos antrais em bovinos apresentam crescimento em ondas (duas a três em média), caracterizadas pelos estágios subseqüentes de crescimento basal, recrutamento, seleção e dominância, podendo atingir seu tamanho pré-ovulatório. O hormônio folículo estimulante (FSH) participa ativamente do recrutamento e emergência da onda folicular. Em média, sete a 11

folículos de aproximadamente 4 mm de diâmetro emergem em alguns dias e entram em uma fase de crescimento semelhante por três dias em bovinos (GINTHER *et al.*, 2003). Ao término do crescimento semelhante, tem-se a fase de desvio onde o folículo dominante (8,5 mm em *Bos taurus*) apresenta maior taxa de crescimento, suprime o crescimento dos folículos subordinados e torna-se dependente do hormônio luteinizante (LH) até que ocorra a ovulação ou atresia (GINTHER *et al.*, 2001).

O aumento na frequência pulsos de LH, estimula o desenvolvimento do folículo dominante que secreta níveis crescentes de estradiol que, por sua vez, induzem o pico pré-ovulatório de LH pela hipófise. Neste momento, o ovócito retoma a divisão meiótica e novamente para em metáfase II (HAFEZ, 2004). Uma série de processos citoplasmáticos ocorre durante a maturação nuclear, tais como: extrusão do primeiro corpúsculo polar (1^oCP), perda das projeções celulares das células do cumulus e reorganização de organelas (De LOOS *et al.*, 1992). A segunda divisão meiótica é completada somente após a fecundação, por ativação promovida pelo espermatozóide, via aumento dos níveis citoplasmáticos de Ca⁺² (JONES, 2005) ou por ativação partenogenética, e inicia-se o desenvolvimento embrionário.

2.2. Metabolismo de CCOs

Pode-se caracterizar o complexo *cumulus* ovócito (CCO) como a unidade funcional dos ovários. Numerosos substratos energéticos (glicose, piruvato, lactato, aminoácidos) são disponibilizados para os CCOs quando no interior do fluido folicular. O gameta feminino e as células somáticas ao seu redor estão em intensa interação e desta ordem torna-se inadequado o estudo metabólico em separado desses dois tipos celulares (SUTTON *et al.*, 2003).

O ovócito metaboliza glicose através da glicólise, da via das pentoses fosfato (PPP) e do ciclo de Krebs. A glicólise contribui com a produção de ATP e disponibiliza piruvato e NADH para oxidação. Por outro lado, a PPP não gera ATP, mas sim NADPH e ribose para a síntese de RNA e DNA, importantes para a adequada maturação nuclear e citoplasmática (KRISHER *et al.*, 2007). CETICA *et al.*, (2002) verificaram que a baixa atividade da fosfofrutoquinase (via glicolítica)

em ovócitos bovinos desnudos durante a maturação, indicando menor participação da via glicolítica no metabolismo do gameta. Por outro lado, em CCOs, as células do *cumulus* apresentaram 102 vezes mais unidades de fosfofrutoquinase do que em ovócitos e a atividade específica, permaneceu muito alta em comparação com os ovócitos desnudos (ODs) durante a maturação. Tais achados suportam o modelo de interação metabólica entre o ovócito e as células do cumulus proposto por SUTTON *et al.* (2003). Segundo esses autores, a glicose captada pelas células do cumulus através de estímulo do FSH, seria metabolizada pela via glicolítica e convertida em piruvato, o qual entraria diretamente no ovócito.

Em bovinos, resultados de CETICA *et al.* (1999) demonstram que a adição de piruvato em meio TCM-199 no cultivo de CCOs não aumentou as taxas de maturação meiótica comparado ao controle (CCOs em TCM-199 sem adição de piruvato). Por outro lado, a adição de piruvato em meio TCM-199 no cultivo de ODs, foi capaz de aumentar a taxa de MIV comparado ao tratamento controle (ODs em TCM-199 sem adição de piruvato). Em humanos, também se verificou que durante a maturação *in vitro* de ODs, o piruvato foi a principal fonte energética e que o meio de cultivo e o estágio de maturação nuclear podem afetar a captação de piruvato e produção de lactato (ROBERTS *et al.*, 2002).

Assim, como em outras células, a glicose pode ser metabolizada através da via das pentoses fosfato no ovócito. A atividade da enzima Glicose-6 Fosfato Desidrogenase (G6PDH) foi quase quatro vezes maior do que a fosfofrutoquinase em ovócitos desnudos, possibilitando destacar um maior envolvimento relativo da PPP do que a via glicolítica no gameta feminino (CETICA *et al.*, 2002). SATO *et al.* (2007) concluíram que a adição de elevada concentração de glicose na MIV de ovócitos suínos, acelera a progressão da maturação nuclear. Segundo os autores, este efeito provavelmente foi devido ao metabolismo de glicose pela PPP.

A G6PDH é a primeira enzima da PPP, catalisando a oxidação de Glicose-6 Fosfato (G-6P) para Glicose-6 Fosfogliconato (6-PG) com concomitante formação da forma reduzida de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH) (CHEUN, 1966). MANGIA e EPSTEIN, (1975) evidenciaram que a atividade absoluta desta enzima foi menor em ovócitos de camundongas de maior diâmetro. Consistente com estes últimos pesquisadores, TSUTSUMI *et al.*, (1992) verificaram que a atividade da G6PDH diminuiu durante a maturação embora

algum aumento foi observado antes da ovulação. Quanto a competência de CCOs, ISHIDA e FUNAHASHI (2007) sugerem que provavelmente ovócitos de folículos médios apresentem maior capacidade de maturação que aqueles originados de folículos pequenos porque as células do cumulus, e não o ovócito, possuem maior atividade de G6PDH durante a MIV.

SUTTON *et al.* (2003) demonstraram que o requerimento metabólico dos CCOs aumenta durante a MIV e concluíram que o maior entendimento das necessidades metabólicas dos CCOs é de grande importância para elaboração de meios de cultivo *in vitro*, cada vez mais adequados as necessidades tanto do ovócito quanto das células do cumulus.

2.3. Transporte de CCOs após OPU

O método de escolha para a obtenção de ovócitos de fêmeas bovinas para a PIV tem sido a Ovum Pick-Up (OPU). Esta ferramenta, desenvolvida para a coleta de ovócitos em humanos e posteriormente adotada em bovinos (CALLESEN *et al.*, 1987) possui como grande vantagem, a aspiração dos ovócitos desejáveis a partir de imagem reproduzida por ultra-som em doadoras vivas. Se usada adequadamente, propicia resultados satisfatórios correspondendo às expectativas. Caso contrário, pode causar seqüelas nos órgãos reprodutivos do animal, comprometendo a saúde do mesmo e o uso contínuo da técnica (VIANA *et al.*, 2003).

Um dos desafios após a OPU é o transporte dos ovócitos. Depois de aspirados, os ovócitos devem ser transportados para o laboratório em menor tempo possível e em condições que não comprometam sua viabilidade. Apesar dos avanços alcançados na PIV, é necessário, buscar as condições e os meios ideais para o transporte de ovócitos do local de coleta até o laboratório.

BUCKETT *et al.* (1999) relataram o primeiro caso de gestação confirmada após o transporte de ovócitos humanos por avião. Apesar da técnica de ICSI em humanos, utilizar ovócitos maturados *in vivo*, este relato demonstrou que é possível o transporte de gametas femininos entre longas distâncias desde que executado com cautela e em condições adequadas.

Um dos fatores que pode comprometer os resultados de PIV é a variação de pH a que os meios de cultivo são submetidos. Para contornar tal situação, o tampão inorgânico *N*-(2-hidroxietil) piperazina-*N'*-2-ácido etanosulfônico (Hepes) tem sido amplamente usado nos meios de cultivo de ovócitos e embriões e apresenta, desde que em concentração adequada, capacidade de reduzir a amplitude de variação do pH (MONTAGNER *et al.*, 2000). Não é difícil imaginar que essa variação de pH nos meios de transporte de ovócitos também ocorra e, por isso, tal tampão é utilizado na grande maioria dos trabalhos.

Em bovinos, TWAGIRAMUNGU *et al.* (1998) verificaram que o meio e o tempo de transporte utilizado podem influenciar na competência *in vitro* dos ovócitos imaturos. Esses autores verificaram que o transporte de ovócitos a 38,5° C em meio TCM -199 + suplementos ou TCM 199 + suplementos+ Hepes por seis horas não afetou as taxas de clivagem e blastocistos após fecundação. Por outro lado, o meio Ham`s F-10 + suplementos, não foi capaz de manter a viabilidade dos ovócitos pelo mesmo período, segundo os mesmos parâmetros avaliados. Ainda, o transporte de ovócitos nos três meios analisados por 24 horas comprometeu o desenvolvimento embrionário.

SCHWARTZ *et al.*, (1998) verificaram que a manutenção em 20° C de CCOs em meio TCM-199 suplementado por 20mM de Hepes por 10h, não afetou as taxas de clivagem e blastocisto. Por outro lado, a produção de blastocistos foi comprometida quando os ovócitos foram mantidos em TL-Hepes, em 20° ou 39° C. Para esses autores, a temperatura de manutenção, mais do que o meio utilizado influencia a capacidade de desenvolvimento dos ovócitos. De fato, WAKAYAMA *et al.* (2004) trabalhando com CCOs de camundongas superovuladas, testando três meios de manutenção (CZB +HEPES, KSOM ou THY) por 24h em três temperaturas (4, 27° C ou (37° C em 5%CO₂)) verificaram que em menores temperaturas, maiores alterações morfológicas e mais danos cromossômicos foram observados. Apesar dos danos verificados, foi possível a obtenção de filhotes a partir de ovócitos fecundados após manutenção por 1 dia em temperatura ambiente (27° C). Corroborando SCHWARTZ *et al.* (1998) as baixas temperaturas comprometem mais a viabilidade dos ovócitos do que o meio escolhido para a manutenção.

WARD *et al.* (2000) analisando os fatores que afetam a PIV utilizando OPU, testaram a manutenção dos CCOs em TCM-199 + HEPES ou TCM-199 + bicarbonato por uma ou cinco horas em banho-maria a 38,5° C. Não foi encontrada diferença em qualquer um dos tratamentos quanto as taxas de clivagem e blastocisto, quando comparado a ovócitos submetidos a MIV imediata. Corroborando esses autores, LEIVAS *et al.* (2004) verificaram que o transporte simulado de CCOs em meio de maturação TCM+HEPES sem controle de atmosfera gasosa, a 39° C por até 12 horas não comprometeu a produção de blastocistos. Entretanto, quando os CCOs foram mantidos por 18 horas, houve queda na taxa de blastocistos no nono dia (D9).

De acordo com os trabalhos, apesar das diferentes metodologias utilizadas, o tampão HEPES apresenta resultados satisfatórios quando adicionado aos meios de transporte de ovócitos sem atmosfera controlada após OPU. No entanto, verifica-se que outros fatores como a temperatura, o meio base utilizado e o tempo podem interferir na viabilidade do gameta. Logo, se fazem necessários, mais estudos sobre o assunto, utilizando técnicas que possam avaliar a competência dos ovócitos após o transporte ou simulação deste.

2.4. Seleção de CCOs por Azul Cresil Brilhante

As condições de cultivo *in vitro* e a competência dos CCOs na PIV se apresentam como grandes responsáveis pelos limitados resultados alcançados. Com o surgimento de novas técnicas de reprodução assistida, cresce a demanda por ovócitos de comprovada competência e que resistam aos procedimentos *in vitro*. Ovócitos aspirados de folículos de 2-6 mm e maturados *in vitro* não apresentam a mesma capacidade de desenvolvimento que aqueles maturados *in vivo* (RIZOS *et al.*, 2002). Por tal razão, além dos critérios morfológicos de avaliação de CCOs, a busca por critérios moleculares também têm ganhado espaço nas pesquisas nos últimos anos (WANG e SUN, 2007).

Na busca por métodos não invasivos de seleção de CCOs, o corante Azul Cresil Brilhante (ACB) tem sido utilizado após seleção morfológica e resultados

positivos quanto a produção de blastocistos em diversas espécies. O critério de seleção via ACB, leva em conta a atividade da enzima G6PDH que, como visto anteriormente, participa ativamente do metabolismo de ovócitos e sua atividade é marcadamente inferior em ovócitos que atingiram seu diâmetro final (ALM *et al.*, 2005). O critério de seleção pelo ACB é então relacionado indiretamente ao diâmetro do ovócito imaturo. Este teste facilita a seleção dos ovócitos completamente desenvolvidos (corados em azul) daqueles em desenvolvimento (não corados) (ROCA *et al.*, 1998). Apesar de ainda não ser completamente entendido de que maneira a enzima G6PDH é capaz de degradar o corante no interior do ovócito, tornando seu citoplasma incolor (ACB-), ALM *et al.* (2005) sugeriram que o ACB funcionaria como um aceptor de elétrons durante a oxidação da glicose-6-fostato e redução de NADP⁺ na presença de suficiente atividade de G6PDH durante via das pentoses fosfato (PPP).

Alguns estudos têm demonstrado que ovócitos imaturos que apresentam maior diâmetro (e menor atividade enzimática de G6PDH), em bovinos (ALM *et al.*, 2005; PUJOL *et al.*, 2004) caprinos (RODRIGUEZ-GONZALEZ *et al.*, 2003) suínos (SHOURBAGY *et al.*, 2006) e camundongos (WU *et al.*, 2007) são corados pelo ACB sem alterar a sua competência de maturação e fertilização, constituindo uma ferramenta potencial de seleção de ovócitos mais competentes.

ALM *et al.* (2005) verificaram que embriões originados de ovócitos corados (ACB+) apresentaram maior número de células que os não corados (ACB-). Da mesma maneira, o ACB se mostra promissor na seleção de ovócitos que serão utilizados como receptores de células para a técnica de transferência nuclear de células somáticas (TNCS) em bovinos. BHOJWANI *et al.* (2007) observaram que o corante se mostrou efetivo e influenciou positivamente as taxas de blastocisto e número de células embrionárias de embriões produzidos por TNCS. Em búfalas, MANJUNATHA *et al.* (2007) verificaram que quanto às taxas de maturação nuclear, de formação dos dois pró-núcleos, de clivagem e blastocisto, os ovócitos ACB+ foram mais competentes que os ACB-. Além disso, a taxa de polispermia em ovócitos incolores foi maior que em ACB+, demonstrando provável distúrbio na função dos grânulos corticais em ovócitos ACB-.

Ovócitos suínos ACB+ apresentam maior volume e maior número de cópias de DNAm. Tal fato demonstra relação com a capacidade de fertilização e

desenvolvimento embrionário, visto que, nas primeiras clivagens, existe forte diluição do genoma mitocondrial devido ao aumento do número de blastômeros e ausência de replicação de DNAm (SHOURBAGY *et al.*, 2006). WU *et al.* (2007) confirmaram que ovócitos de camundongos ACB+ apresentam maior maturação citoplasmática, determinada pelo nível intracelular de GSH e padrão de distribuição de mitocôndrias. Em bovinos, LEE *et al.* (2008) corroboram tais achados, pois também encontraram maior concentração de GSH em ovócitos imaturos ACB + do que ACB -.

Apesar de ALM *et al.*, (2005), BHOJWANI *et al.*, (2007) e MANJUNATHA *et al.* (2007) terem obtido maiores taxas de blastocisto em ovócitos ACB+ quando comparado ao grupo controle (apenas seleção morfológica) alguns estudos, no entanto, não têm confirmado tal hipótese. Em ovócitos bovinos, OPIELA *et al.* (2008) encontraram taxas de blastocisto de ovócitos ACB+ semelhantes ao grupo controle. Da mesma maneira, a taxa de eclosão dos embriões de ambos os grupos não apresentou diferença. Recentemente, MOTA (2008) não obteve maiores taxas de clivagem e blastocistos bovinos a partir de ovócitos ACB+ quando comparado ao grupo controle.

Em caprinos, KATSKA-KSIAZKIEWICZ *et al.* (2007) também não encontraram otimização na seleção dos CCOs através do corante ACB quando comparado a seleção morfológica. Segundo esses autores, a seleção morfológica acurada, por si só, já seria capaz de distinguir ovócitos mais competentes.

Apesar do uso do corante ACB logo após a seleção morfológica ser questionável, quando comparado à seleção morfológica criteriosa, seguramente todos os trabalhos demonstram que atividade da enzima G6PDH está inversamente relacionada à competência de desenvolvimento dos ovócitos. Confirma-se tal afirmativa, pois em todos os trabalhos consultados, se verifica que aqueles ovócitos ACB+ são mais competentes que os classificados como ACB-. Desta forma, o corante ACB é seguramente um método não invasivo de seleção de CCOs capaz de distinguir ovócitos viáveis para a PIV e demais biotécnicas de reprodução assistida.

2.5. Maturação *in vitro* de ovócitos

O primeiro relato da tentativa de maturação *in vitro* de ovócitos bovinos ocorreu há aproximadamente 30 anos, quando a fertilização foi obtida utilizando o oviduto de coelha para a capacitação de espermatozóides de touros (IRATINI E NIWA, 1977).

A maturação nuclear (MN) dos ovócitos é retomada em resposta a gonadotrofinas *in vivo* ou quando são aspirados do interior de folículos para os procedimentos *in vitro*. A MN envolve a ruptura de membrana nuclear ou vesícula germinativa (RVG) e a seqüência de etapas que completam a meiose I (MI) até ocorrer à exclusão de 2º corpúsculo polar, atingindo a em metáfase da 2º divisão meiótica (MII). O MPF (Fator promotor de maturação) é um dos principais reguladores das alterações morfológicas que ocorrem durante a maturação do oócito, regulando a condensação dos cromossomos, o RVG e a reorganização dos microtúbulos (KIM *et al.*, 2000).

Segundo KHATIR *et al.* (1998) após oito horas de MIV a RVG já ocorreu em praticamente todos os ovócitos e em 24 horas, cerca de 90% dos ovócitos de fêmeas bovinas adultas concluíram a meiose I e param em MII. De LOOS *et al.* (1992) ao compararem a MIV com a maturação *in vivo*, observaram que a maioria dos ovócitos mostrou a mesma taxa de maturação nuclear que aqueles maturados *in vivo*.

De acordo com o supracitado, não seria a maturação nuclear *in vitro* a responsável pelos limitados resultados na produção de embriões. As taxas de maturação, fertilização e clivagem entre ovócitos maturados *in vivo* e *in vitro* não apresentam diferença (SIRARD e BLONDIN, 1996). De fato, RIZOS *et al.* (2002) não encontraram diferença entre as taxas de clivagem de ovócitos MIV ou maturados *in vivo*. No entanto, a competência citoplasmática entre esses dois grupos de ovócitos é diferente, visto que, ovócitos maturados *in vitro* apresentam variações no grau de expansão das células do *cumulus* e incorreta distribuição de organelas (De LOOS *et al.*, 1992). Embora, as condições físicas de maturação de ovócitos possam afetar a fertilização (PINYOPUMMINTR e BAVISTER 1995) assim como a composição dos meios, afetar parâmetros de viabilidade embrionária como o número de células e a expressão de genes (RUSSEL *et al.*,

2006), as características intrínsecas de um ovócito ao início da MIV serão determinantes de sua competência para o desenvolvimento embrionário (SIRAD e BLONDIN, 1996).

Tais trabalhos levam a crer que apenas a avaliação da MIV de ovócitos não seria um parâmetro adequado para avaliação da competência *in vitro* dos CCOs. No entanto, dada a heterogeneidade do diâmetro de ovócitos obtidos para a PIV e a interferência desta nas taxas de MII (FAIR et al., 1995; OTOI et al., 1997) o uso do ACB apresenta-se como ferramenta útil na seleção de CCOs mais competentes. ALM et al. (2005) verificaram maiores taxas de MII em ovócitos bovinos classificados como ACB+ do que aqueles ditos ACB-, sendo a capacidade de coloração dos ovócitos indiretamente relacionada ao diâmetro dos mesmos. Corroborando ALM et al., (2005), e MANJUNATHA et al. (2007) encontraram maior taxa de maturação em ovócitos de búfalas ACB+ do que ACB-.

Neste sentido, a seleção de CCOs através do ACB e a posterior avaliação da competência destes em atingir a MII podem ser usadas na avaliação de ovócitos submetidos a condições de transporte simulado.

3. MATERIAL E MÉTODOS.

3.1. Coleta dos ovários e manipulação dos ovócitos.

O experimento foi realizado no período de maio a julho de 2008, no Laboratório de reprodução Animal do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. (LRA-DVT-UFV)

Foram utilizados 195 ovários coletados de fêmeas bovinas, sem raça definida e em diferentes fases do ciclo estral, abatidas em matadouro localizado a 60 Km da UFV. Imediatamente após o abate e evisceração, os ovários foram removidos e imersos em garrafa térmica com solução fisiológica acrescentada de sulfato de estreptomicina (SIRARD e BILODEAU, 1990), em temperatura variando de 35 a 38°C. Em seguida, ao término da coleta, os ovários foram transportados, em garrafa térmica, até o, LRA-DVT-UFV, em tempo máximo de duas horas.

No laboratório, os ovários foram transferidos para uma nova solução fisiológica, acrescida de sulfato de estreptomicina, e colocados em Banho Maria a 37°C. Os folículos ovarianos (≤ 10 mm) foram puncionados por meio de agulha 25 x 7 gauge, acopladas a seringas de cinco mililitros. O líquido folicular contendo os ovócitos, foi depositado em cálice cônico contendo aproximadamente 15 mL de meio Talp Hapes (BAVISTER et al., 1983) mantido aquecido a 37°C. 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 da pipeta de Pasteur, sendo então, transferido para uma placa de Petri, contendo meio Talp-Hepes, mantida em placa aquecedora a 37°C. Com auxílio de um microscópico estereoscópico e uma micropipeta, os ovócitos foram transferidos para outra placa de Petri contendo meio Talp-Hepes 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 meio Talp Hebes, e posteriormente, utilizados nos procedimentos experimentais.

3.2. Delineamento experimental.

Foram utilizados 515 ovócitos imaturos, classificados com cumulus compacto ou mais de três camadas de célula do cumulus (COSTA et al., 1997a), distribuídos em cinco tratamentos. No T1 (testemunha), os ovócitos foram maturados *in vitro* imediatamente após a manipulação. O restante dos ovócitos foi exposto ao corante ACB em dois tempos diferentes, zero e cinco horas. No tempo zero hora, os ovócitos foram expostos 60 min ao ACB. O mesmo procedimento foi realizado com cinco horas, ou seja, os ovócitos permaneceram cinco horas no Talp Hebes e depois 60 min no ACB. Independente do tempo de permanência de cada tratamento, os ovócitos foram mantidos em placa aquecedora a 37°C até o tempo estabelecido. Posteriormente ao tempo de exposição, os ovócitos foram separados em corados zero hora (T2), não corados zero hora (T3), corados cinco horas (T4) e não corados cinco horas (T5) e submetidos à maturação *in vitro*. Foram realizadas três repetições para cada tratamento.

3.3. Coloração dos CCOs por ACB

Os CCOs submetidos a coloração, foram expostos por 60 minutos a solução de 26µm de ACB (B-5388, Sigma, USA) diluídos em meio Talp Hebes com vermelho fenol. A exposição dos CCOs a solução de ACB foi realizada em placas Nunc® sobre placa aquecedora a 37° C. Ao término do período de exposição os CCOs foram lavados 2X em meio Talp Hebes e então divididos em 2 grupos de acordo com a coloração do citoplasma dos oócitos. Oócitos apresentando citoplasma azul foram classificados como ACB+ e aqueles demonstrando citoplasma incolor foram classificados como ACB-.

3.4. Maturação “*in vitro*” de ovócitos após a exposição à diferentes meios e tempo de manutenção

O meio de maturação foi constituído por TCM 199 acrescido de 10% de soro de vaca em estro e 10 µg/mL de FSH (COSTA, 1994). A maturação foi realizada em placas Nunc (Nunc A/S; Cat.176740) de quatro poços, contendo 400 µL de meio de maturação previamente equilibrado por no mínimo duas horas à 38,5°C, em atmosfera de 5% de CO₂, 95% de ar atmosférico e 95% de umidade em estufa incubadora. Os ovócitos foram cultivados nestas condições de temperatura e atmosfera durante 22 a 24 horas. Após este período foram submetidos à avaliação da taxa de maturação.

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

Para avaliação da taxa de maturação, 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 1.000X em imersão, para se 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 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. Foram considerados degenerados os ovócitos que se apresentaram na configuração CCG ou SCC.

3.6. 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

4.1 Taxas de coloração por ACB

Os resultados referentes às taxas de oócitos corados (ACB+) e não corados (ACB-), expostos ao ACB (por uma hora) imediatamente após seleção morfológica ou após cinco horas de manutenção em Talp Hapes, encontram-se dispostos na Tabela 1.

Verificou-se no presente experimento que a taxa de ovócitos ACB+ e ACB- quando os CCOs foram expostos a solução de coloração por uma hora, foram semelhantes às taxas encontradas por MANJUNATHA *et al.* (2007). Esses últimos, apesar de utilizarem ovócitos de búfalas, ao submeterem os CCOs a mesma concentração de ACB (26 μ M) diluído em mPBS e durante o período de 90min de exposição, em condições de incubação, obtiveram taxas de 57% de ovócitos ACB+ e 43% de ovócitos classificados como ACB-, valores próximos aos encontrados neste trabalho. Ao testarem o corante em CCOs bovinos aspirados de ovários de animais abatidos, ALM *et al.* (2005) e MOTA (2008) encontram taxas de 58% (ACB+), 42% (ACB-) e 60% (ACB+), 40% (ACB-) respectivamente, valores também semelhantes aos apresentados neste experimento. Da mesma forma BHOJWANI *et al.* (2007) buscando selecionar ovócitos imaturos bovinos ACB+ para a produção de embriões pela técnica de TNCS, obtiveram 59,4% de ovócitos ACB+ e 40,6% de ovócitos ACB-.

Diferente do presente experimento, os trabalhos até aqui citados expuseram os CCOs a solução de ACB diluído em mPBS, em estufas incubadoras sob condições de atmosfera umidificada e não sobre placa aquecedora em condições de umidade ambiental. Adicionalmente, MOTA (2008) manteve os CCOs por apenas 60 min, ao passo que MANJUNATHA *et al.* (2007), BHOJWANI *et al.* (2007) e ALM *et al.* (2005) incubaram por 90 min. Verificou-se, de acordo com as taxas descritas e comparado a este trabalho, que a exposição dos CCOs

ao ACB em placas Nunc[®] sobre placa aquecedora (sem controle de umidade), não comprometeu a interação entre a G6PDH e o corante, visto que, as taxas de coloração foram semelhantes. Da mesma forma, 60 min de exposição dos CCOs ao ACB são suficientes para que os ovócitos mais competentes se tornem corados de azul, possibilitando a referida seleção bioquímica

Tabela 1: Taxa de coloração de ovócitos expostos ao corante ACB por 60 min imediatamente após seleção morfológica ou após cinco horas de manutenção em Talp Hapes

Tratamento	n	ACB+(%)	ACB-(%)
G1	211	114(54,00) ^a	97(46,0) ^b
G2	219	129(58,9) ^a	90(41,1) ^b

Grupo 1 - Ovócitos expostos ao corante ACB logo após seleção morfológica

Grupo 2 - Ovócitos expostos ao corante ACB após período de cinco horas em Talp Hapes

Letras iguais na mesma coluna indicam valores semelhantes ($p > 0,05$) pelo teste de qui-quadrado.

Com relação aqueles ovócitos mantidos por cinco horas em Talp Hapes (transporte simulado) e em seguida expostos ao corante, não verificado diferença ($p > 0,05$) nas taxas de ACB+ e ACB- quando comparadas à coloração imediatamente após seleção morfológica (Tabela-1).

Diante deste resultado, nota-se que o corante ACB foi capaz de selecionar os ovócitos mais competentes (ACB+) mesmo após longo período em condições de transporte simulado. Provavelmente, os níveis e/ou a atividade da G6PDH dos ovócitos em meio Talp Hapes não tenham se alterado ao longo das cinco horas e dessa forma quando da exposição ao corante, a enzima foi capaz de degradar o ACB da mesma maneira quando é exposto imediatamente.

LEIVAS *et al.* (2004) concluíram que o transporte de ovócitos em meio TCM-HEPES por períodos de até 12 horas a 39° C não determinaram decréscimo

nas taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro* bem como no número de células de blastocistos eclodidos. De acordo com MONTAGNER *et al.* (2000) a adição de Hepes aos meios de maturação de ovócitos (TCM-199 modificado) e desenvolvimento embrionário (KSOM modificado) minimiza a variação de pH, diminuem a variabilidade dos resultados e incrementam os índices de blastocistos.

Dessa forma, o período de apenas cinco horas de simulação de transporte, somado as propriedades de manutenção da viabilidade do gameta proporcionadas pelo tampão Hepes mantiveram os CCOs em condições bem semelhantes aqueles ovócitos imediatamente expostos ao ACB. Desta forma, o corante ACB se mostrou eficaz na seleção de ovócitos bovinos imaturos quando os mesmos foram submetidos a períodos prolongados de transporte simulado.

Wongsrikeao *et al.*, (2006) ao testarem a dupla exposição de CCOs suínos observaram que todos os ovócitos classificados como ACB+ ao início da MIV também exibiram o citoplasma corado após exposição ao corante depois de 44h de MIV. Apesar dos autores utilizarem espécie distinta e meio de cultivo suplementado com outros fatores (objetivando a maturação nuclear *in vitro*), impossibilitando assim, a comparação direta com o meio Talp Hepes, o fato dos ovócitos ACB+ continuarem classificados como ACB+ após 44h, suporta os achados do presente experimento de que a taxa de ovócitos ACB+ após zero ou cinco horas em Talp Hepes continue a mesma.

4.2- Taxas de maturação nuclear

Nesse experimento, foi também avaliado a capacidade de maturação *in vitro* de ovócitos a partir da seleção dos CCOs corados ou não após seleção morfológica ou após cinco horas de manutenção em Talp Hepes. Os resultados encontram-se na Tabela 2.

Em geral, 70-80% dos CCOs bovinos submetidos aos sistemas de maturação *in vitro* atuais, atingem o estágio de MII da meiose (ALM *et al.*, 2005; DODE e ADONA *et al.*, 2001). De acordo com os resultados obtidos neste experimento, observa-se que a taxa de maturação nuclear de ovócitos ACB+ foi superior aqueles ACB-, independente do momento em que foram expostos ao corante. Por outro lado, os ovócitos do grupo ACB+ (zero ou cinco horas) não apresentaram maior capacidade de maturação quando comparado ao grupo

controle. Esses resultados corroboram os achados de Alm *et al.* (2005), os quais também obtiveram maior percentual de ovócitos ACB+ (72,5%) em MII comparado aos ovócitos ACB- (58,1%). Da mesma forma, também não verificaram maior taxa de maturação de ovócitos ACB+ quando comparado ao grupo controle. MANJUNATHA e colaboradores (2007) obtiveram maior percentual de maturação *in vitro* a partir de ovócitos bubalinos ACB+(82,6%) do que os classificados como ACB-(59,2%). No entanto, ovócitos ACB+ também apresentaram o mesmo percentual de maturação que o grupo controle.

Tabela 2 - Maturação nuclear *in vitro* de ovócitos ACB+ e ACB- selecionados após exposição imediata ao corante ou após cinco horas de manutenção em Talp Hepes .

Grupo	n	MI (%)	MII (%)	Degenerados(%)
T1-Controle	105	16 (15,2) ^a	82 (78,1) ^a	7 (6,7) ^a
T2- ACB+	98	5 (5,1) ^b	72 (73,5) ^a	21 (21,4) ^b
T3- ACB-	94	29 (30,9) ^c	36 (38,2) ^b	29 (30,9) ^b
T4- ACB+ (5h)	103	10 (9,7) ^{ab}	68 (66,0) ^a	25 (24,3) ^b
T5- ACB- (5h)	81	24 (29,7) ^c	30 (37,0) ^b	27 (33,3) ^b

Valores com letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferenças ($p < 0,05$) pelo teste do qui-quadrado.

O percentual de maturação nuclear *in vitro* de CCOs pode variar principalmente em função do diâmetro dos ovócitos (OTOI *et al.*, 1997; YONG *et al.*, 1997; FAIR *et al.*, 1995). CHRISTMANN *et al.*, (1994) sugeriram que ovócitos em crescimento, ainda não possuem capacidade de ativar o complexo MPF devido à presença de inibidores desta ativação no ooplasma do gameta. De fato, ANGUIITA *et al.* (2007) observaram que ovócitos de maior diâmetro apresentaram maior atividade de MPF ao término da MIV. Além disso, FAIR *et al.* (1995) argumentaram que ovócitos bovinos apresentando diâmetro $<100 \mu\text{m}$ ainda não

possuem completa capacidade para transcrição e tradução de importantes mRNAs necessários para a síntese e ativação de proteínas requeridas para o rompimento do envelope nuclear. Segundo esses autores, ovócitos bovinos adquirem completa competência meiótica quando apresentam cerca de 110µm.

Trabalhando com ovócitos bovinos de novilhas (7-11 meses), PUJOL *et al.*, (2004) verificaram que ovócitos ACB+ (incluindo a zona pelúcida) apresentam maior diâmetro médio (152,6 µm) que os ACB- (147,0 µm). Maior diâmetro de ovócitos ACB+ também já foi confirmado em porcas (ROCA *et al.* 1998) e cabras pré-puberes (RODRÍGUEZ- GONZÁLEZ *et al.*, 2002). Considerando que, ovócitos ACB+ apresentam menor atividade da enzima G6PDH (Alm *et al.*, 2005) tornando-se corados ao término da exposição e que apresentam em média maior diâmetro que os aqueles ACB-, verifica-se que os ACB+ apresentam maior competência para a retomada da divisão meiótica, fato este confirmado no presente experimento. Verificou-se também que mais ovócitos classificados como ACB- apresentaram a configuração nuclear de MI ao término das 24 de MIV, comparado ao tratamento controle e aos ovócitos ACB+. Tal resultado, demonstra que ovócitos ACB- apresentam atraso e/ou incapacidade de completarem a divisão meiótica. El Shourbagy *et al.*, (2006) demonstraram que ovócitos suínos ACB- apresentam menor número de cópias de DNAm_t do que os ACB+. Ainda, WU *et al.*, (2007) trabalhando com ovócitos de camundongas, observaram que ao término da MIV, os ovócitos ACB- apresentaram um padrão de distribuição mitocondrial mais difuso no citoplasma e não próximo a placa metafásica como aqueles ACB+. Tais trabalhos demonstram que a incompetência citoplasmática de ovócitos ACB- pode comprometer a maturação nuclear.

Observou-se que ovócitos submetidos ao corante ACB (independente da classificação), apresentaram maiores taxas de degeneração ao término da MIV, comparado ao tratamento controle. Segundo ALM *et al.*, (2005) a exposição dos ovócitos ao ACB por 90 min não está associada à alterações na configuração das cromatinas. Mesmo não procedendo análise estatística, verifica-se no trabalho citado, que 12,5% dos ovócitos apresentaram sinais de degeneração logo após aspiração dos folículos. Por outro lado, ao término dos 90 min em solução de ACB foi encontrado 15,7% de ovócitos apresentando sinais de degeneração (cromatina picnótica em vários estágios da meiose ou cromatina degenerada e dispersa pelo

ovócito). Da mesma forma, ao avaliar os mesmos parâmetros após a MIV, ALM e coloradores observaram que 14,6% de ovócitos expostos ao ACB mostraram-se degenerados e ao passo que apenas 5,7% se apresentaram degenerados para o grupo controle (MIV logo após seleção morfológica, sem exposição ao corante). Apesar da concentração mínima para coloração de 26 μ M de ACB estar sendo enfatizada na maioria dos trabalhos, confirmada por MANJUNATHA *et al.*, (2007), e não apresentar efeitos deletérios ao embrião (TIFFIN *et al.*, 1991), KATSKA-KSIAZKIEWICZ *et al.* (2007) observaram que do *pool* total de CCOs de cabras expostos ao ACB, 3,6% do total apresentaram sinais de degeneração no citoplasma. De acordo com os autores alguns ovócitos poderiam ser mais sensíveis ao ACB apresentando características apoptóticas.

O presente experimento mostrou duas possibilidades de importância. Primeiro, mesmo que outros parâmetros como a competência para o desenvolvimento embrionário e a qualidade dos embriões não tenham sido analisados, verificou-se que a seleção não invasiva de CCOs via corante ACB, selecionando ovócitos de maior competência meiótica, é possível na ausência de condições atmosféricas controladas. Em segundo lugar, a verificação de que os ovócitos ainda apresentam capacidade de coloração através do ACB mesmo após cinco horas em Talp HEPES, abre possibilidades para que a seleção bioquímica de CCOs possa ser empregada, mesmo após longo períodos compreendidos da aspiração até o início dos procedimentos *in vitro*. Neste sentido, na ausência de estufas incubadoras, pode-se submeter os CCOs a coloração por ACB sobre placa aquecedora ou executar este mesmo procedimento após chegada em laboratório, num período de até cinco horas de manutenção dos CCOs em Talp HEPES.

FIGURAS.

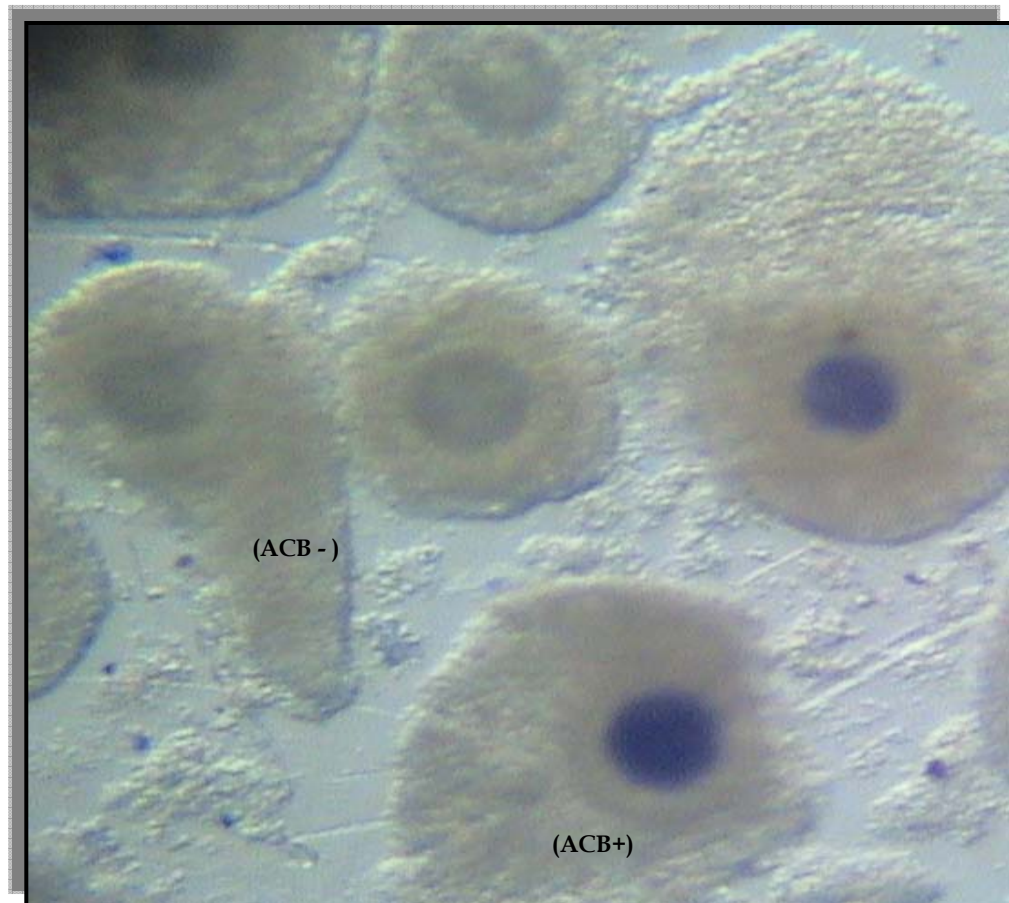


Figura 1. Ovócitos que foram expostos 60 min ao ACB. (ACB-: Não corado; ACB+: Corado)

5. CONCLUSÕES

A capacidade de coloração de ovócitos por ACB não se altera após manutenção dos mesmos por cinco horas em meio Talp Hapes.

A competência de ovócitos ACB+ em atingir o estágio de MII é maior que ovócitos ACB-, mesmo após cinco horas de manutenção dos CCOs em meio Talp Hapes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALM, H.; TORNER, H.; LÖHRKE VIERGUTZ, GHONEIM, I.M.; KANITZ, W. Bovine blastocyst development rate *in vitro* is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Theriogenology**, v.63, p.2194-2205, 2005.
- ANGUITA, B.; JIMENEZ-MACEDO, A.R.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T.; PARAMIO, M.T. Effect of oocytes diameter on meiotic competence, embryo development, p34(cdc2) expression and MPF activity in prepubertal goat oocytes. **Theriogenology**, v.67, p.526-536, 2007.
- BASSO, A.C.; ESPER, C.R. Isolamento e caracterização ultraestrutural de folículos pré-antrais de vacas da raça Nelore. **Braz. J. vet. Res. anim.**, v.39, p.311-319, 2002.
- BAVISTER BD, BALL GD, LEIBFRIED ML, LENZ R, AX RL, FIRST NL. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. **Biol Reprod**, v. 28, p.717-725, 1983.
- BHOJWANI S; ALM, H.; TORNER, H., KANITZ, W., POEHLAND, R. Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear transfer. **Theriogenology**, v. 67, p.341-345, 2007.
- BUCKETT, W.M.; FISCH, P.; DEAN, N.L.; BILJAN, M.M.; TAN, S.L. In vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection pregnancies after successful transport of oocytes by airplane. **Fertility and Sterility**, v.71, p.753-755, 1999.
- BURATINI, J.J. Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.190-196, 2007.
- CALLESEN, H.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, F. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. **Theriogenology**, v.27, p.217, 1987.
- CETICA, P.; PINTOS, L.; DALVIT, G.; BECONI, M. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation *in vitro*. **Reproduction**, v.124, p. 675-681, 2002.
- CETICA, P. D.; PINTOS, L.N.; DALVIT, C.G.; 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.

- CHEUN, L.H. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in erythrocytes of experimental animals. **Journal Clinic Pathology**, v.19, p.614-616, 1966.
- CHRISTMANN L., Jung T., Moor R. M. MPF components and meiotic competence in growing pig oocytes, **Molecular Reproduction and Development.**, v 38, p 85 – 90, 1994
- COSTA, E. P. **Aspectos morfológicos (citológicos e ultraestruturais) e desenvolvimento de ovócitos de bovinos “in vitro”**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 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.; et al. 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.; et al. 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.; et al. 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.
- DE LOOS, F.;VAN MAURIK, P.; VAN BENEDEN, T.; KRUIP T. Structural aspects of bovine oocyte maturation *in vitro*. **Molecular Reproduction Developmental**, v.31, p.208-14, 1992.
- DINIZ, E.G.; ESPER, C. R.; JACOMINI, J.O.; VIEIRA, R.C. Desenvolvimento morfológico dos ovários em embriões e fetos bovinos da raça Nelore. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, n.1, p.70-76, 2005.
- 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.
- EL SHOURBAGY, S.H.E.; SPIKINGS, E.; FREITAS, M.; JOHN, J.C.S. Mitochondria directly influence fertilization outcome in pig. **Reproduction**, v.131, p.233-245.2006.
- FAIR, T.; CARTER, F.; PARK, S.; EVANS, A.C.O.; LONERGAN, P. Global genes expression analysis during bovine oocyte *in vitro* maturation. **Theriogenology**, v.68, p.S91-S97, 2007.

- FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte size in relationship to follicular diameter, maturational competence and rna synthesis. **Theriogenology**, v.43, p.209 1995.
- GINTHER O.J., M.A. Beg, D.R. Bergfelt, F.X. Donadeu, and K. Kot, Follicle selection in monovular species. **Biology of reproduction**, v.65, p 639-647. 2001.
- GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; DONADEU, F.X.; BERGFELT, D.R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**. v.78, p. 239-257, 2003.
- GOTO, K.; KAJIHARA, Y.; KOSAKA, S. Pregnancies after in vitro fertilization of cow follicular oocytes, their incubation in vitro and transfer to the cow uterus. **Theriogenology**, v. 29, p.251, 1988.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 7ª ed. Ed.Manole, 2004.
- HANNA, C.; CHARLES, L.; HINRICHS, K.; WESTHUSIN, M.; KRAEMER, D. Assessment of canine oocyte viability after transportation and storage under different conditions. **Animal Reproduction Science**, v.105, p.451-456, 2008.
- HENDRISKEN, P.J.M.; VOS, P.L.A.M.; STEENWEG, 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.
- HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23-32, 1997.
- IRITANI, A.; NIWA, K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. **J. Reprod. Fertil.**, v.50, p.119-121, 1977.
- ISHIDA, Y.; FUNAHASHI, H. Distribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase and *in vitro* maturation of porcine oocyte-cumulus complexes from small and medium follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v.19, p.287, 2007.
- JONES, K.T. Mammalian egg activation: from Ca⁺² spiking to cell cycle progression. **Reproduction**, v.130, p.813-823, 2005.
- KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; OPIELA, J.; RYNSKA, B. Effects of oocyte quality, semen donor and embryo co-culture system on the efficiency of blastocyst production in goats. **Theriogenology**, v. 68, p. 736-744, 2007.
- KHATIR, H.; LONERGAN, P.; MERMILLOD, P. Kinetics of nuclear maturation and protein profiles of oocytes from prepubertal and adult cattle during in vitro maturation. **Theriogenolgy**, v.50, p. 917-929, 1998.

- KIM, N.H. et al. The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes *in vitro* maturation. **Zygotec**, v.8, p.25-32, 2000.
- KRISHNER, 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.
- LEE, H.S.; KOO, D.B.; LEE, K.K.; YIN, X.J.; KONG, I.K. Intracellular glutathione concentration and *in vitro* development of bovine oocytes selected by Brilliant Cresyl Blue. **Reproduction, Fertility and Development**, v.20, p.150, 2008.
- LEIVAS, F.G.; BRUM, D.S.; MEZZALANA, A.; PILLA, L.F.C.; BERNARDI, M.L.; RUBIN, M.I.B.; SILVA, C.A.M. Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação sem controle de atmosfera gasosa. **Ciência Rural**, v.34, p.219-224, 2004.
- MANGIA, F.; EPSTEIN, C.J. Biochemical studies of growing mouse oocytes: Preparation of oocytes and analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase activities. **Developmental Biology**, v.45, p.211-220, 1975.
- MANJUNATHA, B.M.; GUPTA, P.S.P.; DEVERAJ, M.; RAVINDRA, J.P.; NANDI, S. Selection of developmentally competent buffalo oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM. **Theriogenology**, v.68, p.1299-1304, 2007.
- MONTAGNER, M.M.; GONÇALVES, P.B.D.; NEVES, J.P.; COSTA, L.F.S.; BORTOLOTO, E.B.; FARIAS, A.M.; STRANIERI, P. Hepes na produção de embriões bovinos *in vitro*. **Ciência Rural**, v.30, p.469-474, 2000.
- MOTA, G.B. **Desenvolvimento e expressão gênica em oócitos bovinos imaturos selecionados por Azul Cresil Brilhante**. Departamento de Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa-UFV. Viçosa-MG. 2008. 47p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia, área de concentração em Reprodução Animal).
- OPIELA, J.; KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; LIPINSKI, D.; SLOMSKI, R.; BZOWSKA, M.; RYNSKA, B. Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax, and development competence following IVP in cattle. **Theriogenology**, v 69, p 546-555, 2008
- OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; KOYAMA, N.; TACHIKAWA, S.; SUZUKI, T. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. **Theriogenology**, v.48, p.769-774, 1997.
- PINYOPUMMINTR, T.; BAVISTER, B.D. Optimum gas atmosphere for *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.44, p.471-477, 1995.

- PUJOL, M.; BÉJAR-LOPES, M.; PARAMIO, M.T. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. **Theriogenology**, v.61, p.735-744, 2004.
- RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, v. 61, p.234-248, 2002.
- ROBERTS, R.; FRANKS, S.; HARDY, K. Culture environment modulates maturation and metabolism of human oocytes. *Human Reproduction*, v.17, p.2950-2956, 2002.
- ROCA, J.; MARTINEZ,E.; VAZQUEZ, J.M.; LUCAS,X. Selection of immature pig oocytes for homologous *in vitro* penetration assays with the brilliant cresyl blue test. **Reproduction Fertility Development** , v.10, p.479-485,1998.
- RODRIGUES-GONZALEZ, E.; LOPEZ-BEJAR M. et al. Selection of prepubertad gota oocyte using the brilliant cresyl blue test. **Theriogenology** 57, 1397-409. 2002.
- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ,E.; LÓPEZ-BEJAR, M.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M.T. Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue and matured with cysteamine supplementation. **Reprod.Nutr.Dev.**, v. 43, p.179-187,2003.
- RUSSEL, D.F.; BAQIR, S.; BORDIGNON, J.; BETTS, D.H. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.1255-1270, 2006.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002, 265p.
- SATO, H.; IWATA, H.; HAYASHI, T.; KIMURA, K.; KUWAYAMA, T.; MONJI, Y. The effect of glucose on the progression of the nuclear maturation of pig oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.99, p.299-305, 2007.
- SENBON, S.; HIRAO, Y.; MIYANO, T. Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lesson from in vitro culture. **Journal of Reproduction and Development**, v.49, p. 259-269, 2003.
- SIRARD, M. A. e BILODEAU, S. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 43, n. 5, p. 777-783, 1990
- 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, p.217, 1998.
- SHOURBAGY, S.H.E.; SPIKINGS, E.; FREITAS, M.; JOHN, J.C.S. Mitochondria directly influence fertilization outcome in pig. **Reproduction**, v.131, p.233-245.2006.
- SIRARD, M.A.; BLONDIN, P. Oocyte maturation and IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.417-426, 1996.
- SUTTON, M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Effects of *in-vivo* and *in vitro* environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Human Reproduction Update**, v.19, p.35-48, 2003.
- THIBIER, M. Transfers of both *in vivo* derived and *in vitro* produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species in 2005. Data Retrieval Committee Annual Report, IETS, **Newsletter**, v.24, p. 12-18, 2006.
- TIFFIN, G.J.; RIEGER,D.; BETTERIDGE, K.J.; YADAV B.R.; KING, W.A. Glucose and glutamine metabolism in pre-attachment cattle embryos in relation to sex and stage of development. **J. Reprod. Fert.**, v.93, p. 125–32 1991.
- TSUTSUMI, O; SATOH , K ; TAKETANI ,Y ; KATO T. Determination of enzyme activities of energy metabolism in the maturing rat oocyte. **Molecular Reproduction and Development**, v.33, p.333-337, 1992.
- 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.
- VAN DEN HURK. R.; ZAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717-1757, 2005.
- VIANA, J.H.M.; NASCIMENTO, A.A.; PINHEIRO, N.L.; FERREIRA, A.M; CAMARGO, L.S.A.; SÁ, W.F.; MARQUES JR, A.P. Caracterização de seqüelas subseqüentes à punção folicular em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, p.119-124, 2003.
- YONG, H. Y.; LEE, B. C.; HWANG, W. S. Effect of oocyte diameter on *in vitro* nuclear maturation of Korean native cattle oocyte. **Theriogenology**, v.47, p. 205,1997.
- YUAN, Y.Q.; VAN SOOM, A.; LEROY, J.L.M.R.; DEWULF, J.; VAN ZEVEREN, A.; DE KRUIF, A.; PEELMAN, L.J. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. **Theriogenology**, v.63, p.2147-2163, 2005.

- WAKAYAMA, S.; THUAN, N.V.; KISHIGAMI, S.; OHTA, H.; MIZUTANI, E.; HIKICHI, T.; MIYAKE, M.; WAKAYAMA, T. Production of offspring from one-day-old oocytes stored at room temperature. **Journal of Reproduction and Development**, v.50, p.627-637, 2004.
- WANG, Q.; SUN, Q-Y. Evaluation of oocytes quality: morphological, cellular and molecular predictors. **Reproduction, Fertility and Development**, v.19, p. 1-12, 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.
- WONGSRIKEAO, P; OTOI , T; YAMASAKI , H; AGUNG, B; TANIGUCHI, M; NAOI, H; SHIMIZU, R; NAGAI, T. Effects of single and double exposure to brilliant cresyl blue on the selection of porcine oocytes for *in vitro* production of embryos. **Theriogenology** ,v.66, p.366–372, 2006.
- WU, Y-G.; LIU, Y.; ZHOU, P.; LAN, G-C.; HAN, D.; MIAO, D-Q.; TAN, J-H. Selection of oocytes for *in vitro* maturation by brilliant cresyl blue staining: a study using the mouse model. **Cell Research**, v.17, p. 722-731, 2007.