

GUSTAVO BRUNO MOTA

**DESENVOLVIMENTO E EXPRESSÃO GÊNICA EM
OÓCITOS BOVINOS IMATUROS SELECIONADOS POR
AZUL CRESIL BRILHANTE**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

GUSTAVO BRUNO MOTA

**DESENVOLVIMENTO E EXPRESSÃO GÊNICA EM
OÓCITOS BOVINOS IMATUROS SELECIONADOS POR
AZUL CRESIL BRILHANTE**

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

APROVADA: 28 de fevereiro de 2008.

Prof. Giovanni Ribeiro de Carvalho
(Co-orientador)

Prof. Eduardo Paulino da Costa
(Co-orientador)

Dr. João Henrique Moreira Viana

Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Prof. Ciro Alexandre Alves Torres
(Orientador)

*Aos meus pais, Magno José Mota e
Maria Elizabeth Bruno Mota*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre iluminando meus passos.

Aos meus pais, Magno José Mota e Maria Elizabeth Bruno Mota, pelo amor, apoio e por terem sempre alguma palavra nos bons e maus momentos.

As minhas irmãs Camila e Mariana, por serem meus amores e sempre torcerem por mim.

A Leonardo Horta e ao recém nascido Caio Mota Horta, que já torce aos “berros” pro tio Gustavo.

A todos os familiares, pela torcida.

Ao professor Ciro Alexandre Alves Torres pela amizade, orientação e por conceder a oportunidade dos estudos de Pós-Graduação na área de Reprodução Animal pela Universidade Federal de Viçosa.

Ao pesquisador Luiz Sérgio de Almeida Camargo, por ter concedido a oportunidade e todos os meios para que este trabalho fosse realizado na Embrapa Gado de Leite, pelo exemplo de profissional, orientação, ensinamentos passados, amizade e paciência.

Aos pesquisadores da Embrapa Gado de Leite João Henrique Moreira Viana, Wanderlei Ferreira de Sá, Humberto Brandão, Marta Fonseca Guimarães e Marco Antonio Machado, pela orientação e apoio nas diversas etapas deste trabalho.

A Dra. Lílian Tamy Iguma, pelo excelente convívio, apoio, orientação e enriquecedoras conversas sobre “o mundo” comercial da PIV.

Aos amigos Ribrio Ivan Pereira Batista, Raquel Varela Serapião e Vivian Eugênio Rodrigues pelo companheirismo e ajuda direta e incondicional que

ofereceram para a execução dos trabalhos.

A equipe do Laboratório de Reprodução que de alguma forma contribui, Michele, Sabine, Mariana, Bruno, Isabela, Paulo, Bianca, Joel, Myro e Fabrício.

A equipe do Laboratório de Genética Molecular, em especial Vanessa e Robert pelo apoio nas etapas relacionadas à expressão gênica.

Aos amigos Guilherme e Hugo por serem grandes amigos desde os tempos de graduação e compartilharem divertidos momentos em Juiz de Fora.

Aos amigos de Pós-Graduação, Charles, Guilherme, Vinício, Miller e Joana pela amizade e companheirismo.

Aos estagiários de Reprodução da Zootecnia, Aline e Renan.

Aos Professores da UFV, Giovanni Ribeiro de Carvalho, Eduardo Paulino da Costa, José Domingos Guimarães e Tarcízio Antonio Rego de Paula pelos ensinamentos e conselhos na área de Reprodução Animal.

A todos os funcionários da Embrapa Gado de Leite que trabalham para manter em atividade esta importante instituição de pesquisa.

Ao Frigorífico Fripai por ceder os ovários para a realização dos trabalhos.

BIOGRAFIA

GUSTAVO BRUNO MOTA, filho de Magno José Mota e Maria Elizabeth Bruno Mota, nascido em Barra Mansa, no Estado do Rio de Janeiro, em 2 de maio de 1979.

Em março de 2000, iniciou o curso de Medicina Veterinária na Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), em Campos dos Goytacazes – RJ, graduando-se em 14 de maio de 2005.

Em maio de 2006, iniciou o Programa de Pós Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, na área de reprodução animal, submetendo-se à defesa de tese em 4 de março de 2008.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Oogênese e foliculogênese.....	4
2.2. Competência oocitária.....	6
2.3. Expressão gênica em oócitos.....	8
2.4. Seleção morfológica de CCOs para PIV.....	11
2.5. Via das pentoses fosfato no oócito.....	13
2.6. Seleção de oócitos por Azul Cresil Brilhante.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Local.....	17
3.2. Coleta dos ovários.....	17
3.3. Seleção dos CCOs.....	18
3.4. Coloração dos CCOs por Azul Cresil Brilhante.....	18
3.5. Grupos experimentais.....	19
3.6. Maturação <i>in vitro</i> dos CCOs.....	19
3.7. Fecundação <i>in vitro</i> dos oócitos.....	20
3.8. Cultivo <i>in vitro</i> dos embriões.....	20
3.9. Congelação para análise.....	20
3.10. Extração de RNA.....	21

3.11. PCR em tempo real.....	21
3.12. Análise estatística.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1. Taxa de corados e desenvolvimento <i>in vitro</i>	28
4.2. Expressão gênica.....	35
5. CONCLUSÕES.....	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Sequência de <i>primers</i> e temperatura de anelamento específicas para cada gene alvo.....	23
2 Desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos submetidos a seleção por Azul Cresil Brilhante.....	29
3 Médias e desvios padrão das taxas de competência cinética dos zigotos 48h após fecundação de oócitos imaturos selecionados por Azul Cresil Brilhante.....	30
4 Médias e desvios-padrão de expressão relativa dos transcritos MATER e Zar-1 em oócitos imaturos selecionados por ACB.....	36

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Curva de amplificação produzida em Real Time PCR.....	24
2 Eletroforese dos fragmentos de cDNA amplificados por PCR em tempo real a partir de <i>primers</i> específicos dos genes β -Actina, MATER e Zar-1.....	25
3 Coloração dos oócitos por ACB após 60 min em condições de incubação.....	26

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μM	micro Molar
ACB	Azul Cresil Brilhante
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
BSA	Albumina sérica bovina
CCOs	Complexos <i>cumulus</i> -oócito
cDNA	DNA complementar
CG	Células germinativa
CGPs	Células germinativa primordiais
CR2aa	Meio de cultivo Charle Ronsenkranz
DNA	Acido Desoxirribonucléico
DNAmt	DNA mitocondrial
FSH	Hormônio folículo estimulante
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GSH	Glutathiona
KL	<i>kit</i> -ligante
LH	Hormônio luteinizante
MATER	Maternal Antigen that Embryos Require
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mPBS	Solução tampão fosfato modificada
MPF	Fator promotor de maturação
NADPH	Transportador de elétrons
OPU	<i>Ovum pick-up</i> (Punção folicular guiada por ultrassom)
PCR	Reação de polimerização em cadeia
PIV	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PPP	Via das Pentoses Fosfato
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
SFB	Soro fetal bovino
TCM	Meio para cultura de tecidos
TNCS	Transferência nuclear de células somáticas
Zar-1	Zygotic arrest 1
ZP	Zona pelúcida

RESUMO

MOTA, Gustavo Bruno, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. Desenvolvimento e expressão gênica em oócitos bovinos imaturos selecionados por Azul Cresil Brilhante. Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres. Co-orientadores: Giovanni Ribeiro de Carvalho e Eduardo Paulino da Costa.

A eficiência da produção *in vitro* de embriões (PIV) tem sido limitada pelas condições de cultivo *in vitro* e baixa competência dos oócitos utilizados na maturação *in vitro*. A utilização do corante Azul Cresil Brilhante (ACB) associado à seleção morfológica convencional, tem sido descrita como uma alternativa para seleção de oócitos de melhor qualidade. Objetivou-se neste trabalho avaliar o uso do ACB como método de seleção de oócitos imaturos bovinos, utilizando como parâmetros de avaliação o desenvolvimento embrionário e a expressão de genes envolvidos na transição do genoma materno-zigótica. Na primeira etapa, um total de 998 oócitos foram distribuídos em 4 grupos: G1-Controle: oócitos submetidos à maturação sem exposição ao corante ; G2-Controle de incubação (mPBS): oócitos mantidos em mPBS por 1h a temperatura de 38,5° C em ar atmosférico; G3-ACB+: oócitos mantidos em mPBS adicionado de ACB, nas mesmas condições de G2, que apresentaram ao final da incubação citoplasma corado; G4- ACB-: oócitos mantidos em mPBS adicionado de ACB nas mesma condições de G2, que ao final da incubação apresentaram citoplasma incolor. Os oócitos de cada tratamento foram maturados, fertilizados e os possíveis zigotos cultivados *in vitro* por oito dias. As taxas de clivagem foram obtidas 48h após início do cultivo e as taxas de blastocistos oito dias após fecundação. As taxas de clivagem de G1 e G3 foram semelhantes, no entanto foram maiores que G2 e G4, as quais semelhantes. Os

oócitos G3 apresentaram taxas de blastocisto semelhantes ao G1 e G2, mas foram maiores do que o G4. Na segunda etapa, o RNA total foi extraído de três *pools* de 12 oócitos imaturos obtidos dos mesmos tratamentos acima descritos e usados para gerar cDNA. A abundância relativa dos transcritos MATER e Zar-1 foi analisada por Real Time-PCR. Não foi encontrada diferença na expressão relativa dos transcritos MATER e Zar-1 entre os tratamentos. Em conclusão, a seleção morfológica convencional associada à seleção pelo corante ACB pode ser usada como método de seleção de oócitos imaturos, distinguindo duas populações de oócitos com diferente competência de desenvolvimento, no entanto esta dupla seleção não selecionou oócitos mais competentes quando utilizado unicamente o critério morfológico convencional de seleção. Além disso, o corante não foi capaz de selecionar oócitos com diferente padrão na expressão dos transcritos MATER e Zar-1.

ABSTRACT

MOTA, Gustavo Bruno, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february 2008. Development and gene expression of immature bovine oocytes selected by Brilliant Cresyl Blue. Adviser: Ciro Alexandre Alves Torres. Co-Advisers: Giovanni Ribeiro de Carvalho and Eduardo Paulino da Costa.

The *in vitro* embryo production (IVP) efficiency has been limited by oocyte developmental competence and *in vitro* culture conditions. The use of Brilliant Cresyl Blue (BCB) dye has been described as an alternative method for selection of better quality oocytes. The aim of this work was to evaluate the selection of immature oocytes by BCB dye and the expression of transcripts involved in the transition from genome-maternal. In the first step, a total of 998 immature oocytes was distributed into: G1- Control: oocytes sent directly to *in vitro* maturation, not exposed to the dye; G2- Control incubation (mPBS): oocytes exposed to mPBS solution without BCB for 1h; G3- BCB+: oocytes exposed to mPBS added of BCB and positively stained; G4- BCB-: oocytes exposed to mPBS with BCB and colorless. Oocytes of each treatment were matured, fertilized and presumptive zygotes were cultured *in vitro* for eight days. The rates of cleavage were obtained at 48h after the beginning of the culture and the rates of blastocysts at eight days post fertilization. The cleavage rates between G1 and G3 were similar, but higher than G2 and G4, the ones which similar. The oocytes in G3 showed blastocyst rate similar to the G1 and G2, but higher than G4. In another step, total RNA was extracted from three pools of 12 immature oocytes obtained from each group and used to generate cDNA. The relative abundance of MATER and Zar-1 transcripts

was analyzed by Real Time PCR. No difference was found on relative expression for MATER and Zar-1 among groups. In conclusion, the conventional morphologic selection associated to the selection by BCB dye can be used as method of selection of immature oocyte, distinguishing two oocytes populations with different development competence, however this double selection did not select more competent oocytes when used only the conventional morphologic assessment. Moreover, the dye is not able to select oocytes with different patterns of expression transcripts MATER and Zar-1.

1-INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma das biotécnicas reprodutivas mais utilizadas em animais da espécie bovina. Dados divulgados pelo *Data Retrieval Committee*, da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), referentes ao ano de 2005, registram valores de mais de 265.000 embriões produzidos no mundo. Apesar do custo ainda elevado, a América do Sul e, particularmente o Brasil, responde por aproximadamente 50% do total das transferências de embriões produzidos *in vitro* no mundo (VIANA, 2006). Inicialmente restrita aos meios acadêmicos, grande impulso dessa biotecnologia ocorreu a partir do final da década de 80, quando foi desenvolvida a técnica de aspiração folicular guiada por ultra-som, que permitiu a obtenção de oócitos de doadoras vivas. Técnica indispensável nos programas de melhoramento genético no país, a PIV mostra atualmente um cenário positivo com um total de 196.663 embriões transferidos ao longo do ano de 2006. Desse montante, aproximadamente 90% foram transferências de embriões zebuínos de corte, com expressiva predominância da raça Nelore (VIANA e CAMARGO, 2007).

Aumento do número de produtos/vaca/ano, a possibilidade de utilização de fêmeas em diferentes estágios fisiológicos, como a pré-puberdade, início de gestação, além do aproveitamento de vacas senis ou que não respondem a tratamentos superovulatórios são alguns dos atrativos da PIV (DODE e RUMPF, 2002). Contudo, a proporção reduzida de embriões obtidos em relação aos oócitos selecionados e a qualidade dos embriões gerados têm limitado a difusão da técnica. Atualmente, esses valores variam de 20 a 40%, com índices de gestação em torno de 35% do total transferido, sendo o teste final do sucesso da técnica, o nascimento de um animal saudável. LONERGAN e FAIR (2008) destacam que o

desconhecimento da origem dos oócitos utilizados (estádio do ciclo estral ou estágio da onda folicular) e sua qualidade, a variabilidade de capacidade de fecundação entre touros e as condições de cultivo *in vitro* pós-fecundação são alguns dos fatores que determinam a quantidade e a qualidade dos embriões produzidos.

Comparativamente àqueles produzidos *in vivo*, os embriões produzidos *in vitro* apresentam uma série de características responsáveis por baixos resultados. Aspectos morfológicos, metabólicos (KRISHER *et al.*, 1999), incidência de apoptose (POMAR *et al.*, 2005), padrão de expressão gênica (LONERGAN *et al.*, 2006) e o cariótipo (HYTTEL *et al.*, 2003) são algumas das características alteradas pelas condições de cultivo *in vitro*, e que podem comprometer, também, a resistência desses embriões à criopreservação. Evidências indicam que o potencial de desenvolvimento de embriões PIV depende da qualidade dos oócitos dos quais se originam (KHURANA *et al.*, 1999), sendo que essa qualidade afeta o estabelecimento da prenhez e o desenvolvimento embrionário e fetal.

A seleção de oócitos realizada atualmente baseia-se em critérios morfológicos, mas apesar de mostrar resultados satisfatórios, pode não demonstrar a real qualidade do oócito quanto à competência nuclear, citoplasmática e molecular (DODE, 2006). Isso demanda busca constante por métodos não-invasivos de seleção de oócitos de maior competência, visando à produção de embriões de melhor qualidade e maior potencial de desenvolvimento, uma vez que as condições *in vitro* ainda estão muito aquém daquelas *in vivo*.

Combinada a seleção morfológica, a coloração pelo Azul Cresil Brillhante (ACB) tem sido utilizada como um método não-invasivo para seleção de oócitos imaturos em diversas espécies (ALM *et al.*, 2005; PUJOL *et al.*, 2004; WONGSRIKEAO *et al.*, 2006, WU *et al.*, 2007), com resultados positivos em relação ao método de seleção morfológica quando utilizado unicamente. Este corante é capaz de detectar a atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), presente em maior concentração em oócitos em crescimento.

Paralelamente, a expressão de genes associados à competência de oócitos e embriões tem sido extensivamente utilizada por diversos grupos de pesquisa na busca por marcadores de viabilidade de gametas e embriões, e demonstra ser

ferramenta útil na busca por maior compreensão dos processos que ocorrem no interior das células. Os transcritos de origem materna, MATER e Zar-1 estão relacionados à transição do genoma materno-zigoto e têm sido avaliados em oócitos imaturos (WU *et al.*, 2003; BREVINI *et al.*, 2004).

Dessa forma, o presente trabalho reuniu informações de desenvolvimento *in vitro* e expressão dos genes acima especificados em oócitos imaturos após seleção pelo referido método, a fim de se investigar a real eficiência da coloração por ACB.

2-REVISÃO DE LITERATURA

2.1.Oogênese e Foliculogênese

A transformação das oogônias em oócitos ou oogênese é completada em todos os mamíferos domésticos durante a vida fetal ou logo após o nascimento. Estima-se uma população de 120 a 150 mil oócitos primários contidos em folículos primordiais em fêmeas bovinas ao nascimento (YANG *et al.*, 1998).

As células do epiblasto, durante a gastrulação, se tornam células germinativas primordiais (CGPs). Estas por sua vez migram até as gônadas em formação onde apresentam alta atividade mitótica e transcricional (PICTON *et al.*, 1998). As CGPs se tornam oogônias e são circundadas por células somáticas para formarem os cordões corticais. A partir de então, as oôgonias entram em meiose tornando-se oócitos. Os oócitos passam pelas fases de leptóteno, zigóteno e paquíteno até ficarem “parados” na fase de diplóteno da prófase I.

Coincidente com a parada da primeira divisão meiótica, tem-se a formação dos folículos primordiais, caracterizados por oócitos rodeados por uma camada de células da granulosa (CGs) achatadas ou achatadas e cuboidais, posteriormente folículos primários, rodeados por uma camada simples de CGs cuboidais e folículos secundários circundados por duas ou mais CGs cuboidais (BASSO e ESPER, 2002). Durante a fase de folículo secundário, o oócito apresenta intenso crescimento com marcante síntese de RNA e proteínas, aumento no número de ribossomos, mitocôndrias e reorganização das organelas existentes. É ainda durante esta fase que se tem o surgimento dos grânulos corticais e a formação da zona pelúcida (ZP) (HYTTEL *et al.*, 1997).

O desenvolvimento desses folículos pré-antrais, é conduzido por fatores locais que controlam a proliferação e diferenciação das células da granulosa, promovendo o crescimento folicular e oocitário. Ao longo do crescimento oocitário, junções comunicantes (*gap junctions*) são formadas e possibilitam a comunicação bidirecional entre o oolema e as CGs. Nutrientes, precursores metabólicos, sinais hormonais e sinais inibitórios ou estimulatórios da meiose são transferidos por essa via (van den HURK e ZAO 2005).

Durante o desenvolvimento folicular, sob provável ação conjunta do hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), activina, e *kit*-ligante (KL), a cavidade antral (antro) é formada e se desenvolve até o folículo atingir seu diâmetro próximo ao ovulatório. Em folículos de cerca de 3 mm de diâmetro, o oócito pode atingir seu diâmetro final associado com quase completa inatividade transcricional (FAIR *et al.*, 1995).

Segundo Ginther (2000) quando os folículos de fêmeas bovinas atingem aproximadamente 4 mm, entram na fase de recrutamento, posteriormente seleção e finalmente dominância folicular ao atingirem cerca de 8mm. Quando apresentam de 7,7 a 8,0 mm, inicia-se a fase de desvio, o qual é caracterizado pelo contínuo crescimento do maior folículo, e bloqueio do crescimento dos folículos subordinados. A fase de crescimento do folículo dominante está associada com alta frequência de pulsos de LH. HYTTEL *et al.* (1997) destacaram que durante o crescimento do folículo dominante, diversas alterações ocorrem no interior do oócito como aumento nos níveis de lipídeo e posicionamento mais superficial dos grânulos corticais. A etapa entre o final do crescimento e início da maturação *in vivo* com o pico pré-ovulatório de LH tem sido denominada capacitação oocitária.

Logo após o pico pré-ovulatório de LH os oócitos retomam a meiose atingindo a maturação nuclear e citoplasmática. O objetivo da maturação final do oócito é que este se torne equipado com os componentes necessários para o sucesso da fertilização e desenvolvimento inicial do embrião (HYTTEL *et al.*, 1997). Correto número e disposição de mitocôndrias, grânulos corticais e demais organelas, além de estoques suficientes de RNAs e proteínas envolvidas na complexidade de eventos que se passam no interior do gameta feminino irão conferir ao mesmo, competência molecular, citoplasmática e nuclear.

Com relação ao processo de maturação nuclear, na prófase I ocorre a reversão do primeiro bloqueio meiótico. Neste momento, o oócito apresenta condensação gradual da cromatina, desaparecimento do nucléolo e desintegração da membrana nuclear. A meiose prossegue até o segundo bloqueio meiótico, na metáfase II, quando ocorre a expulsão do primeiro corpúsculo polar, sendo que este permanece até a fecundação (MAYES e SIRARD, 2001). Credita-se ao LH a perda de funcionalidade das *gap-junctions* entre as células do cumulus e o oócito, tal evento levaria a uma diminuição da concentração de AMPc permitindo a retomada da primeira parada da meiose. Entre outros eventos, é bem estabelecida uma complexa cascata de fosforilação e desfosforilação do fator promotor de maturação (MPF), responsável pela retomada da meiose. O MPF é um complexo formado por ciclina B, subunidade regulatória, e p34 (cdc2) kinase, subunidade catalítica. Este fator é capaz de fosforilar proteínas que formam o envelope nuclear e aquelas envolvidas na condensação da cromatina e reorganização do citoesqueleto (van den HURK e ZAO 2005).

2.2.Competência oocitária

Os baixos resultados da PIV podem ser seguramente atribuídos a dois principais fatores: as condições de cultivo *in vitro* (RUSSEL *et al.*, 2006) e a qualidade dos oócitos selecionados para a maturação *in vitro* (MIV) (CAMARGO *et al.*, 2006). Os oócitos coletados são originados de folículos antrais de tamanho médio que não completaram sua capacitação e então não possuem estrutura completa para suportar o início da embriogênese. Além do que a retirada de complexos *cumulus*-oócito (CCOs) do interior de folículos resulta da perda da inibição natural da meiose, levando a uma maturação *in vitro* espontânea (GILCHRIST e THOMPSON, 2007).

A maturação oocitária envolve mudanças nucleares, citoplasmáticas e moleculares. Dessa forma a competência do oócito em estar apto a fecundação e proporcionar o desenvolvimento embrionário está associado a uma série de eventos. De Loss *et al.* (1992) demonstraram que oócitos obtidos de folículos entre 3 a 8 mm de diâmetro e maturados *in vitro*, apresentam praticamente o

mesmo potencial de maturação nuclear que oócitos maturados *in vivo*. Entretanto, aqueles maturados *in vitro* mostram incompleta expansão das células do cumulus, disposição incorreta dos grânulos corticais e por vezes vacuolização no citoplasma.

Ali *et al.* (2004) observaram que a adição de fluido folicular de folículos maiores que 8 mm ao meio de maturação foi capaz de aumentar a produção de embriões. Corroborando, Lequarre *et al.* (2005) observaram menor potencial de produção de blastocistos *in vitro* de oócitos oriundos de folículos <4 mm que aqueles > 6 mm. Isto demonstra que o diâmetro folicular está diretamente relacionado à competência oocitária.

Otoi *et al.* (1997) encontraram grande heterogeneidade no diâmetro de oócitos aspirados de folículos de 1 a 7 mm. Os autores concluíram que a habilidade de atingir a metáfase II é maior em oócitos a partir de 115 µm, mas aqueles ≥120 µm apresentaram maiores taxas de produção de blastocistos. Da mesma forma Lechniak *et al.* (2002) encontraram mais anormalidades cromossomais em oócitos de menor diâmetro após MIV. Neste estudo, oócitos com diâmetro médio de 113,16 µm não apresentaram o mesmo potencial para alcançarem a configuração haplóide que células com 116,83 µm ao término de 24h da MIV. Tais resultados podem ser justificados pela atividade do fator promotor da maturação ser maior em maiores oócitos após MIV, pois os níveis de expressão de RNA p34 (cdc2) são maiores também em oócitos maiores antes da maturação *in vitro* (ANGUITA *et al.*, 2007). Consistente com esses estudos, Fair *et al.* (1995) demonstraram que oócitos bovinos com diâmetro abaixo dos 110µm mostraram maior grau de incorporação de H-uridina que aqueles maiores de 110µm, sugerindo síntese de RNA e ainda crescimento da célula. Notando-se que a competência oocitária é adquirida ao longo do crescimento do oócito e que o diâmetro dos folículos aspirados para a PIV está entre 3-8 mm, existe a necessidade de um método de seleção que possibilite um grupo mais homogêneo de oócitos.

Além dos oócitos utilizados na PIV não apresentarem completa competência molecular, por ainda não terem atingido seu diâmetro completo, os folículos aspirados também podem estar em processo de atresia, o que pode comprometer a qualidade oocitária. Um estudo de Hagemann (1999) demonstrou

que oócitos obtidos de folículos subordinados durante a fase de dominância folicular, apresentam menor potencial de produção de embriões *in vitro*. Além disso, independente do diâmetro folicular, maior porcentagem de células apoptóticas foram observadas em CCOs obtidos dos folículos durante a fase de dominância. Ghanem *et al.* (2007) compararam a expressão gênica de oócitos obtidos de folículos nas fases de crescimento e dominância. Cinquenta e um genes foram diferentemente expressos entre as duas populações de oócitos. Genes ligados a biossíntese de proteínas, organização do citoesqueleto e cromossomos foram mais expressos em oócitos originados da fase de crescimento. Por outro lado, genes associados ao processo de apoptose e a baixa competência oocitária, por exemplo, foram mais expressos em oócitos aspirados na fase de dominância.

Apesar do supracitado, Han *et al.* (2006) encontraram efeito benéfico da atresia folicular inicial na competência de oócitos. Esses autores obtiveram maiores taxas de desenvolvimento de estágios de mórula e blastocisto, em cabras, quando oócitos foram obtidos de folículos apresentando entre 5-30% de porcentagem de células apoptóticas. Mais que 50% de células foliculares apoptóticas comprometeram a competência do oócito. De fato, estudos anteriores demonstraram que a atresia inicial e moderada tende a melhorar a competência *in vitro* de oócitos bovinos (BLONDIN e SIRARD, 1995; HENDRIKSEN *et al.*, 2000).

Pode-se destacar então que, ao longo do desenvolvimento oocitário no interior do folículo, uma série de eventos inter-relacionados são responsáveis pela qualidade do oócito. Um estoque ótimo de RNAm para a aquisição de competência nuclear e citoplasmática se faz necessário para o desenvolvimento embrionário durante a pré-implantação. Neste sentido, oócitos ainda em crescimento não possuem completa habilidade de desenvolvimento, logo, a heterogeneidade do *pool* de oócitos obtidos através de coletas guiadas por ultrassom (OPU) ou aqueles aspirados de ovários de animais abatidos, afeta de forma importante os resultados da PIV.

2.3. Expressão gênica em oócitos

Os genes são as regiões do DNA cromossômico que estão envolvidas na produção de proteínas pelas células. A informação nos genes é usada pela célula em duas etapas de transferência de informação: o DNA é transcrito em RNAm, que é então traduzido na seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo (GRIFFITHS *et al.*, 2006). Segundo Fair *et al.* (2007) no mínimo 8000 genes são expressos em oócitos bovinos, destes foi demonstrado que 821 genes foram diferentemente expressos entre oócitos imaturos e maturados *in vitro*.

Nos últimos anos, genes de origem materna têm recebido forte atenção devido à importância destes para o desenvolvimento inicial do embrião. O estudo da função desses genes, e seus mecanismos regulatórios, é importante para o melhor conhecimento das bases moleculares envolvidas no desenvolvimento embrionário. A transição no desenvolvimento embrionário que ocorre após a fertilização é denominada transição materno-zigótica ou ativação do genoma embrionário. Neste momento, o desenvolvimento embrionário inicialmente determinado por proteínas e transcritos maternos, passa a ser comandado por transcritos produzidos pelo embrião. Este período de transição em embriões bovinos ocorre por volta do estágio de quatro a oito células (SCHULTZ, 2002). Em oócitos que alcançam seu diâmetro final em folículos de aproximadamente 3 mm, a transcrição praticamente cessa e os RNAm maternos e as proteínas são direcionados para os processos de maturação, fertilização e clivagens iniciais até a ativação do genoma embrionário (WRENZYCKI *et al.*, 2007). Por outro lado, até atingir este estágio, genes conhecidos como *genes de efeito materno* são de extrema importância para a precisa coordenação de processos que ocorrem durante as primeiras divisões celulares do embrião (FAIR *et al.*, 2007). Donnison e Pfeffer (2004) via análise quantitativa de transcritos por real-time PCR, verificaram que o nível de transcritos associados ao desenvolvimento pré-implantação e ao nascimento, apresentaram menores valores relativos em oócitos pouco competentes.

Um estudo (TONG *et al.*, 2000) usando camundongas nocauteadas para o gene MATER (Maternal Antigen that Embryos Require ou NALP5), observou que os animais apresentaram fenótipo normal com relação a foliculogênese, ovulação e fertilização. Em contrapartida os embriões atingiam o estágio de duas células, mas não seguiam adiante seu desenvolvimento. Os autores concluíram que

MATER é um gene de herança materna requerido para o desenvolvimento embrionário a partir de duas células, período no qual ocorre a ativação do genoma embrionário nesta espécie. A proteína MATER foi predominantemente localizada no citoplasma do oócito, mas sua presença também foi detectada no núcleo, mitocôndria e nucléolo (TONG *et al.*, 2004).

Os genes MATER e Zygotic arrest 1(Zar-1) recentemente identificados também em oócitos imaturos humanos (ZHANG *et al.*, 2007) são exemplos de genes que participam da ativação do genoma embrionário (WU *et al.*, 2003). Ariu *et al.* (2006) revelaram pela técnica de PCR em tempo real que oócitos ovinos imaturos, em fase de vesícula germinativa (VG), apresentaram maior nível de transcritos Zar-1, com marcante queda nesses valores em embriões no estágio de oito células e desaparecimento do transcrito em mórulas e blastocistos. Em bovinos, os níveis de Zar-1 são relativamente constantes durante o desenvolvimento embrionário, com exceção no estágio de quatro células, onde um aumento significativo é observado (BREVINI *et al.*, 2004). Pennetier *et al.* (2004) foram os primeiros a reportarem a expressão dos genes MATER e Zar-1 em oócitos bovinos. Os autores observaram padrão de expressão gênica em oócitos imaturos e persistência até embriões de cinco a oito células. No entanto, o padrão de transcrição não foi reativado após o período de ativação do genoma embrionário. Tecidos de outros órgãos foram avaliados e não foi detectada a presença dos referidos transcritos no útero, coração, baço, intestino, fígado, pulmão, glândula mamária e músculo.

Corroborando esses resultados Pennetier *et al.* (2006), mais tarde, observaram que a proteína MATER é estocada no citoplasma ao longo do crescimento dos oócitos e sua presença foi detectada já em folículos primários. E apesar da queda de transcritos após o estágio de cinco a oito células a proteína foi fortemente degradada apenas após a eclosão embrionária, visto que, a partir desta fase, o embrião sintetiza grande quantidade de RNAm e proteínas. Apesar da precisa função da proteína MATER ainda ser desconhecida, os autores sugerem capacidade de conferir estabilidade aos transcritos originados do núcleo durante o estoque no citoplasma, até o momento em que são recrutados para a tradução no oócito ou embrião.

Em oócitos humanos imaturos, 10.183 genes foram identificados, sendo que 45% destes ainda permanecem sem função biológica conhecida (ZHANG *et al.*, 2007). O conhecimento mais preciso da expressão de genes em oócitos e embriões, nos diversos períodos de desenvolvimento, seria crucial para o melhor entendimento dos processos moleculares e o refino das técnicas de reprodução assistida. Neste contexto, o padrão dos transcritos MATER e Zar-1 podem fornecer consistentes informações associadas à qualidade de oócitos imaturos visto a importância desses transcritos para a fase de transição genômica.

2.4. Seleção morfológica de CCOs para PIV

Com relação ao desenvolvimento pré-implantação, inúmeras evidências demonstram que o potencial de desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* depende da qualidade dos oócitos dos quais se originam, influenciando a qualidade embrionária (NEMCOVA *et al.*, 2006; VANDAELE *et al.*, 2007), o estabelecimento da prenhez e o desenvolvimento fetal. O critério rotineiramente utilizado pela quase totalidade dos laboratórios, para seleção de oócitos, está relacionado à morfologia do complexo *cumulus*-oócito (CCO) e aspecto do citoplasma, classificados em quatro categorias (Grau I a IV). Apesar da qualidade do oócito estar diretamente relacionada ao número de células do cumulus e ao grau de compactação destas (MADISON *et al.*, 1992) os baixos resultados da técnica podem ser justificados pela baixa qualidade dos oócitos que são selecionados para a MIV, visto que os critérios morfológicos utilizados são subjetivos e podem apresentar relativa variação quanto a real capacidade de desenvolvimento dessas células (DE LOOS *et al.*, 1992).

Vassena *et al.* (2003) obtiveram melhores taxas de produção de blastocistos a partir de oócitos obtidos de folículos coletados no 5º dia do ciclo estral. Entretanto, apesar da qualidade morfológica dos oócitos ser positivamente ligada a bons resultados na PIV, esses autores observaram que a qualidade morfológica não mudou ao longo da onda folicular e que a porcentagem de CCOs degenerados aumentou do dia 3 para os dias 5 e 7 do ciclo. Tal estudo serve

como base para revisar os critérios morfológicos de seleção de oócitos nos laboratórios de PIV.

Hawk e Wall, (1994) observaram que alguns oócitos classificados no amplo grupo de qualidade “intermediária-marginal” (células da granulosa compactas eventualmente aderidas - poucas células cobrindo metade ou toda a zona pelúcida, com citoplasma demonstrando grânulos finos de tamanhos moderados) possuem potencial de desenvolvimento normal e alguns podem ter potencial reduzido. Mas, dentro deste grupo, o subgrupo caracterizado por mínima quantidade de células do cumulus apresentou as menores taxas de blastocistos expandidos. Segundo Pereira *et al.* (2007) oócitos classificados como grau II (uma a três camadas de células do cumulus) não apresentam diferença quanto às taxas de clivagem de oócitos grau I (mais de três camadas de células compactas do cumulus), e apesar do uso de oócitos de menor qualidade aumentar a produção total de blastocistos, esta prática diminui a porcentagem de blastocistos comparada aos obtidos de oócitos grau I.

Segundo Han *et al.* (2006) o potencial de desenvolvimento de oócitos proveniente de folículos de mesmo tamanho, CCOs de mesma morfologia e mesmo grau de expansão de células do cumulus, diferem de acordo com o nível de apoptose das CGs. Por outro lado, em mesmo percentual de apoptose dessas células, a capacidade de desenvolvimento de oócitos varia com o tamanho do folículo, morfologia dos CCOs e grau de expansão do cumulus. Isto sugere que o potencial de desenvolvimento oocitário é determinado pela interação de múltiplos fatores.

Somado a isto, apesar da origem e qualidade do animal ser desconhecida, oócitos recuperados de ovários de matadouro são comumente utilizados em estudos dos processos de maturação, fertilização, produção e criopreservação de embriões. Geralmente são obtidos CCOs por aspiração de folículos antrais de 3-8 mm. Entretanto muitas dessas células seguramente ainda não foram expostas a concentrações ideais de hormônios e fatores de crescimento que resultariam no acúmulo de RNAm maternos e proteínas importantes, não só para maturação mas para etapas de desenvolvimento que se seguem (DIELEMAN *et al.*, 2002), sendo importante para a competência molecular, que é determinada pela composição e

quantidade de transcritos e que são estocados durante o crescimento e fase final da foliculogênese (DODE, 2006).

2.5. Via das pentoses fosfato no oócito

Nos vegetais superiores e nos animais, a glicose tem três destinos principais: pode ser armazenada (como um polissacarídeo ou como sacarose), ser oxidada a compostos de três átomos de carbono (piruvato) via glicólise; ou ser oxidada a pentoses através da via das pentoses fosfato (PPP) ou via do fosfogliconato. A primeira reação da via das pentoses fosfato é a desidrogenação enzimática da glicose-6-fosfato pela glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Ao final da reação tem-se Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e ribose-5-fosfato. O NADPH é um transportador de energia química na forma de poder redutor. Uma segunda função da via das pentoses é gerar pentoses empregadas na biossíntese dos ácidos nucleicos (LEHNINGER *et al.*, 1995). A intensa comunicação entre as células do cumulus e oócito ao longo da oogênese e foliculogênese, limita o estudo mais preciso de metabolismo dos CCOs. Numerosos substratos energéticos (glicose, piruvato, lactato, aminoácidos) são disponibilizados para os CCOs quando no interior do fluido folicular.

Segundo modelo proposto por Sutton *et al.* (2003) existe interação metabólica entre células do cumulus e oócitos. O FSH estimula o metabolismo de glicose pelas células do cumulus. A glicólise e a PPP nestas células, forneceriam piruvato e NADPH ao oócito respectivamente. O piruvato serviria de substrato para o ciclo de Krebs e o NADPH participaria na redução da (GSH) substância importante que atua contra o estresse oxidativo.

Tsutsumi *et al.* (1992) destacaram que oócitos imaturos de roedores ainda em estágio de VG e antes do estímulo de LH, apresentam alta atividade de G6PDH em comparação com diversos tipos de tecido, demonstrando que oócitos possuem elevado potencial para atividade da PPP. Por outro lado a atividade da hexoquinase (via glicolítica) é marcadamente baixa em oócitos, o que indica que a utilização de glicose é limitada por esta fase da via glicolítica. Segundo Cetica *et al.* (2002) a atividade da G6PDH em oócitos bovinos desnudos é

aproximadamente quatro vezes maior do que a atividade observada de fosfofrutoquinase (via glicolítica). Tais trabalhos demonstram que existe um maior envolvimento relativo da via das pentoses do que enzimas envolvidas na glicólise. De outra forma, a atividade da G6PDH também observada nas células do cumulus poderia disponibilizar NADPH para a síntese de lipídeos estruturais nestas células, ou para transferi-lo para o oócito. Ishida e Funahashi (2007) sugerem que provavelmente oócitos de folículos médios apresentem maior capacidade de maturação que aqueles originados de folículos pequenos porque as células do cumulus, e não o oócito, possuem maior atividade de G6PDH durante a MIV. Outrossim, a atividade da G6PDH esta correlacionada à proliferação celular e sua inibição pode comprometer o crescimento celular (TIAN *et al.*, 1998).

Existem poucos estudos relacionados a enzimas chaves que participam do processo de metabolismo de glicose, e estes relatam diferenças entre espécies. Mangia e Epstein (1975) demonstraram queda na atividade enzimática da G6PDH em oócitos em camundongos jovens, com diâmetro acima de 80-85 μm . Alta atividade da G6PDH é observada em oócitos quando caracterizados como imaturos, e em contraste, a atividade da enzima decresce durante a maturação oocitária (TSUTSUMI *et al.*, 1992). O metabolismo de glicose no oócito é importante durante a maturação. Diferenças observadas nas taxas metabólicas entre oócitos de fêmeas pré-pubescentes e adultas é função do pequeno tamanho de oócitos vindos de ovários pré-pubescentes. Assim, um atraso na geração de NADPH e riboses pode contribuir para o pobre desenvolvimento de oócitos de animais pré-pubescentes (STEEVES e GARDNER, 1999). Levesque e Sirard (1994) observaram que oócitos oriundos de ovários de vacas adultas que apresentaram parada de desenvolvimento embrionário nas fases de mórula e blastocisto, apresentavam o mesmo perfil protéico de oócitos de fêmeas pré-pubescentes.

Os trabalhos suportam a idéia de que atividade da enzima G6PDH pode indicar se o oócito já atingiu o término de seu crescimento e, como já mencionado, o tamanho do oócito é crítico para a maturação, fecundação e subsequente desenvolvimento embrionário.

2.6. Seleção de oócitos por Azul Cresil Brilhante

No campo da produção de animais domésticos, como também na medicina humana e nos estudos ligados a preservação de espécies, biotecnologias reprodutivas tais como a fertilização *in vitro* (FIV), transgenia e clonagem possuem aplicação limitada visto que nem todos os oócitos estão realmente aptos para desenvolverem *in vitro*. Somente métodos invasivos que causam a destruição do oócito são capazes de predizer com relativa precisão a qualidade dos mesmos. Neste sentido a busca por métodos não invasivos de seleção de oócitos mais competentes para a PIV é crescente.

Recentemente tem se utilizado o corante Azul Cresil Brilhante (ACB) para tal finalidade. Esta substância é capaz de determinar a atividade da enzima Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em oócitos. O ACB permite determinar a atividade intracelular de G6PDH, elevada em oócitos em crescimento, mas diminuída em oócitos que atingem seu crescimento final (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2003). Apesar de ainda não ser completamente entendido de que maneira a enzima G6PDH é capaz de degradar o corante no interior do oócito, tornando seu citoplasma incolor, 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 oócitos 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) e suínos (SHOURBAGY *et al.*, 2006) são corados pelo ACB sem alterar a sua competência de maturação e fertilização, constituindo uma ferramenta potencial de seleção de oócitos mais competentes. Segundo Alm *et al.* (2005) embriões originados de oócitos corados (ACB+) apresentaram também maior número de células que os não corados (ACB-). Da mesma maneira, na seleção de oócitos para técnica de transferência nuclear de células somáticas (TNCS) em bovinos, o ACB *test* se mostrou efetivo e influenciou positivamente as taxas de blastocisto e número de células embrionárias (BHOJWANI *et al.*, 2007). Em búfalas,

Manjunatha *et al.* (2007) encontraram maior incidência de polispermia em oócitos ACB-, demonstrando deficiente maturação citoplasmática dos mesmos.

Oócitos suínos ACB+ apresentam maior volume e maior número de cópias de DNAm. Tal fato demonstra forte 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 oócitos 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 oócitos imaturos ACB + do que ACB -.

O critério de seleção pelo ACB é então relacionado indiretamente ao diâmetro do oócito imaturo. Este teste facilita a seleção dos oócitos completamente crescidos (corados em azul) daqueles em crescimento (não corados) (ROCA *et al.*, 1998). Os trabalhos permitem especular que oócitos ACB+ são mais competentes quanto à abundância de importantes transcritos e dessa forma poderiam otimizar a PIV de embriões bovinos. Nesse contexto, a proposta deste trabalho foi de avaliar a competência de oócitos obtidos de ovários de matadouro e selecionados pelo corante ACB, quanto ao desenvolvimento embrionário *in vitro* e à expressão de genes ligados a transição materno-zigótica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local

O experimento foi realizado na Embrapa Gado de Leite, Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite em Juiz de Fora - MG. Os embriões foram produzidos no laboratório de Reprodução Animal e as análises de PCR em tempo real foram feitas no laboratório Genética Molecular Dr. Mário Luiz Martinez.

O experimento foi dividido em duas etapas:

1ª: Desenvolvimento *in vitro*

Os embriões foram produzidos seguindo-se os procedimentos dos itens 3.2 a 3.8. Os resultados de desenvolvimento *in vitro* foram analisados a partir de dados obtidos de oito repetições.

2ª: Expressão gênica

A análise de expressão gênica foi realizada seguindo-se os itens 3.2; 3.3; 3.4; 3.5; 3.9; 3.10; e 3.11.

3.2. Coleta dos ovários

Os ovários foram obtidos de vacas mestiças abatidas em matadouro local e transportados ao laboratório em garrafas térmicas, contendo solução fisiológica (0,9% NaCl e 0,1g/L de sulfato de estreptomicina), à temperatura entre 30-32 °C. No laboratório, os mesmos foram lavados em solução salina e mantidos em banho-maria a 37 °C até a aspiração dos oócitos. Os folículos com diâmetro entre 3-8 mm tiveram seus oócitos aspirados com o auxílio de uma agulha calibre 21 G acoplada a uma seringa de 10 mL. O período entre o abate e o início da aspiração não foi superior a 3 horas. Os oócitos recuperados foram selecionados sob microscópio estereoscópio com aumento final de 50X .

3.3. Seleção dos CCOs

Como critério de seleção dos oócitos foi utilizado o método descrito por Viana et al. (2004) com adaptações:

Grau I - CCOs compacto, mais de três camadas de células do cumulus e oócito com citoplasma homogêneo.

Grau II - CCOs compacto com três ou menos camadas de células do cumulus ou oócito com citoplasma levemente heterogêneo.

Grau III- oócitos parcialmente desnudos, mostrando remoção de células do cumulus em menos de 1/3 da superfície da zona pelúcida.

Grau IV- desnudo e/ou degenerado, oócitos sem células do cumulus na maior parte da superfície da zona pelúcida e/ ou vacuolização e encolhimento do citoplasma.

Cumulus expandido - CCOs mostrando expansão das células do cumulus.

Os oócitos foram selecionados, classificados e lavados 2 vezes em meio TALP. Foi utilizado no trabalho apenas CCOs classificados como grau I e II.

3.4. Coloração dos CCOs por Azul Cresil Brilhante (ACB)

Imediatamente após a coleta e classificação morfológica, do total de CCOs obtidos graus I e II, 530 foram expostos ao ACB em condições de incubação

(26µM de ACB diluído em mPBS* por 60 min a 38,5 °C em ar atmosférico umidificado). Outros 462 CCOs foram divididos entre controle (251) (sem exposição ao corante e maturação direta) e expostos ao mPBS (WHITTINGHAM, 1971) apenas (211) (sem ACB por 60 min a 38,5 °C em ar atmosférico umidificado). O corante ACB foi obtido da empresa Sigma-Aldrich™. O tempo de incubação dos oócitos em meio contendo o corante ACB de 60 min assim como a concentração utilizada, de 26µM, estão de acordo com Manjunatha *et al* (2007).

O número de CCOs apresentado acima, são referentes apenas a 1ª etapa do experimento (produção *in vitro* dos embriões).

* mPBS = DMPBS-FLUSH (Nutricell Nutrientes Celulares-Campinas-SP) + 0,4% de BSA.

3.5. Grupos Experimentais

G1 (MIV) - sem exposição ao ACB, prosseguindo para a maturação;

G2 (mPBS) - expostos ao mPBS sem ACB, mantidos em condições de incubação já descritas;

G3 (ACB+) - expostos a solução de ACB diluído em mPBS, mantidos nas mesmas condições do G2 e classificados como corados;

G4 (ACB-)-submetidos às mesmas condições do G3, porem classificados como não corados.

Os grupos G3 e G4 foram formados em função do resultado da coloração por ACB após incubação.

3.6. Maturação *in vitro* dos CCOs

Os CCOs originados dos quatro grupos experimentais foram submetidos a maturação *in vitro* em TCM 199 acrescido de 10% de soro de vaca em estro e 20µg/mL de FSH em cada poço. A maturação foi realizada em estufa incubadora a 38,5 °C, com 5% de CO2 em ar atmosférico e 95% de umidade, por 24 horas.

3.7. Fecundação *in vitro* dos oócitos

Após a maturação os oócitos foram fecundados *in vitro* com sêmen previamente selecionado. Para preparação dos espermatozóides foi utilizado o método de gradiente de Percoll. A fecundação foi realizada em gotas, sob óleo mineral, de 70 µL em meio FERT-TALP acrescido de 10 µL / mL de heparina e com 2×10^6 espermatozóides/mL, por um período de no máximo 22 horas nas mesmas condições de maturação.

3.8. Cultivo *in vitro* dos embriões

Os possíveis zigotos foram transferidos para o meio CR2aa (Wilkinson et al., 1996) acrescido de 10% de soro fetal bovino em gotas de 50µL sob óleo mineral, onde foram co-cultivados com células da granulosa nas mesmas condições de fecundação. Após 48 horas do início do cultivo, 50% do meio foi renovado e a taxa de clivagem avaliada. No oitavo dia foi avaliada a taxa de blastocisto. As taxas de clivagem e blastocisto foram avaliadas em função do total de CCOs submetidos à maturação *in vitro*.

3.9. Congelação para análise

Na 2ª etapa do experimento, os quatro grupos experimentais foram obtidos seguindo-se os mesmos itens 3.2 a 3.5 da 1ª etapa.

Pools de 12 oócitos desnudos (após pipetagem em meio TALP) de cada grupo experimental foram lavados três vezes no meio citado (para completa retirada de células do cumulus) e rapidamente congelados em criotubos por imersão em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA. As amostras foram estocadas em freezer a temperatura de -80° C até extração de RNA.

3.10. Extração de RNA

A extração de RNA foi feita a partir do RNA total de 12 oócitos desnudos de cada grupo experimental. A extração foi realizada em três repetições. A extração foi realizada utilizando-se o kit comercial RNeasy Micro Kit - QIAGEN™, seguindo-se as recomendações do fabricante. Logo em seguida, foram produzidos cDNAs por transcrição reversa em aparelho termociclador (RT-PCR), utilizando-se o kit de transcrição reversa ImProm-II Reverse Transcription System - PROMEGA™, de acordo com recomendações do fabricante. Ao término desta etapa foram obtidos 20µl de amostra de cDNA.

3.11. PCR em Tempo Real

Amostras de cDNA de oócitos imaturos dos quatro tratamentos, foram analisadas via PCR em tempo real, utilizando o Sistema de PCR 7300 da Applied Biosystems. A quantificação absoluta foi realizada em duplicata, sendo a mistura da reação composta de iTaq™ SYBR Green Supermix e cDNA equivalente a 0,9 oócitos (1,5µl) e primers específicos (β-Actina, MATER e Zar-1) para cada gene, em um volume final de 25µL por reação. Para os genes alvo foi realizado um total de 35 ciclos térmicos. A seqüência dos oligonucleotídeos, a temperatura de anelamento, o tamanho do fragmento e o código de acesso do GeneBank estão apresentados na Tabela 1. O gene β-Actina foi utilizado como referência endógena. As reações de PCR foram conduzidas a 95 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos a 95 °C por 15 segundos, temperatura de anelamento de 53 °C para os três primers por 30 segundos e elongação (extensão) a 60 °C por 30 segundos. A curva produzida pela reação do *primer* específico para o gene Zar-1 esta exemplificada pela Figura 1.

O cálculo da quantificação relativa para MATER e Zar-1 foi realizado pelo método do Ct Comparativo (Livjak et al., 2001), usando a amostra com o maior valor encontrado no grupo G1 (MIV) como calibradora. Os valores são mostrados como “x” vezes a amostra calibradora.

A eficiência dos *primers* para cada reação foi calculada usando o programa LinRegPCR (RAMAKERS *et al.*, 2003). A eficiência média dos *primers* para cada gene foi calculada considerando-se todos os grupos, sendo de $1,86 \pm 0,07$ para o gene da β -actina (referência), $1,86 \pm 0,05$ para o MATER e $1,91 \pm 0,09$ para o Zar-1. Na fórmula para o cálculo de quantificação relativa pelo método do Ct Comparativo usou-se os valores da eficiência dos *primers* dos genes MATER e Zar-1. O tamanho dos fragmentos foi confirmado por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo (Figura 2). Controles negativos sem ácido nucléico também foram conduzidos simultaneamente.

Tabela 1: Seqüência de *primers* e temperatura de anelamento específicas para cada gene alvo

Gene	Seqüência	Temp. anelamento	Tam. do produto (pb)	Nº acesso GeneBank
β -actina	5' GACATCCGCAAGGACCTCTA 3' 5' ACATCTGCTGGAAGGTGGAC 3'	53 °C	205	NM_173979
MATER	5' AATGACGACGCTGTGTTCTG 3' 5' GCGGTTCTCAGGTTCTTCAG 3'	53 °C	206	NM_001007814
Zar -1	5' TGCCGAACATGCCAGAAG 3' 5' TCACAGGATAGGCGTTTGC 3'	53 °C	188	NM_001076203

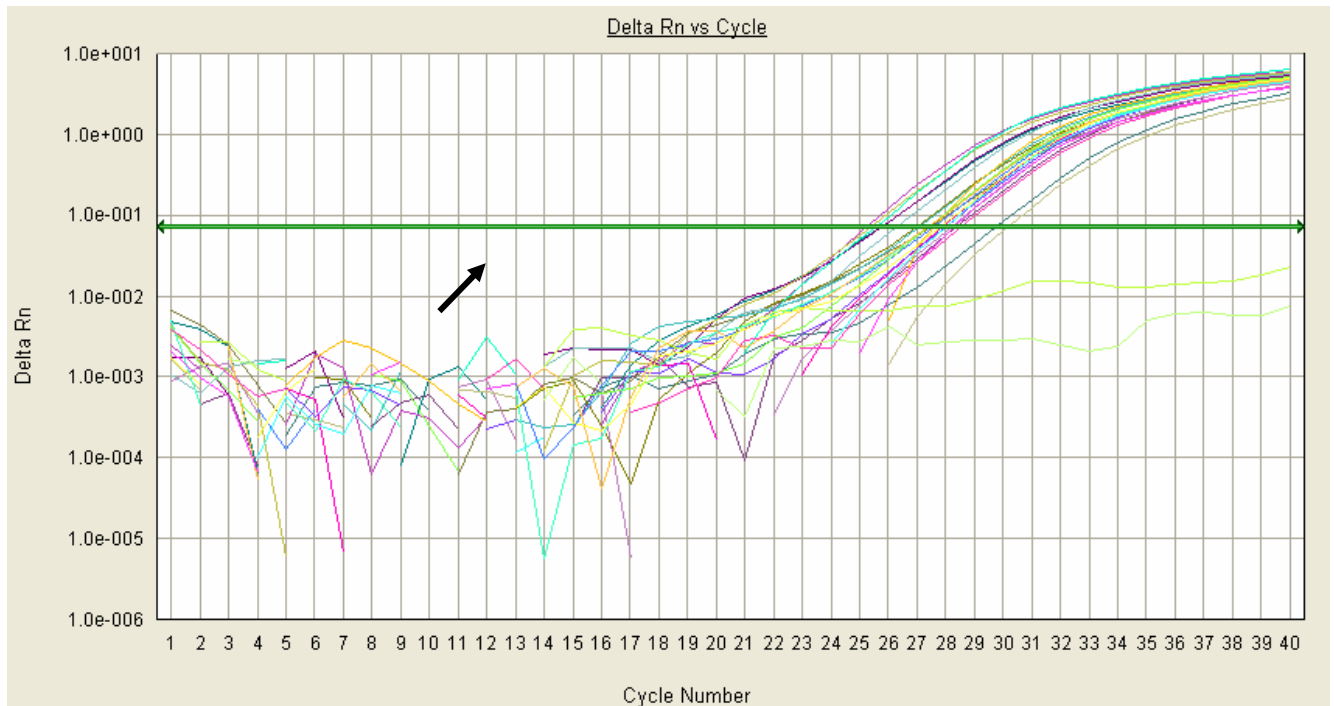


Figura 1: Curva de amplificação produzida em Real Time PCR. A reta verde (*threshold*) indicada pela seta, marca o valor da intensidade de fluorescência, durante a fase de amplificação exponencial, em que todas as amostras foram comparadas. O ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de fluorescência (Ct) serve como base para a comparação entre as amostras.

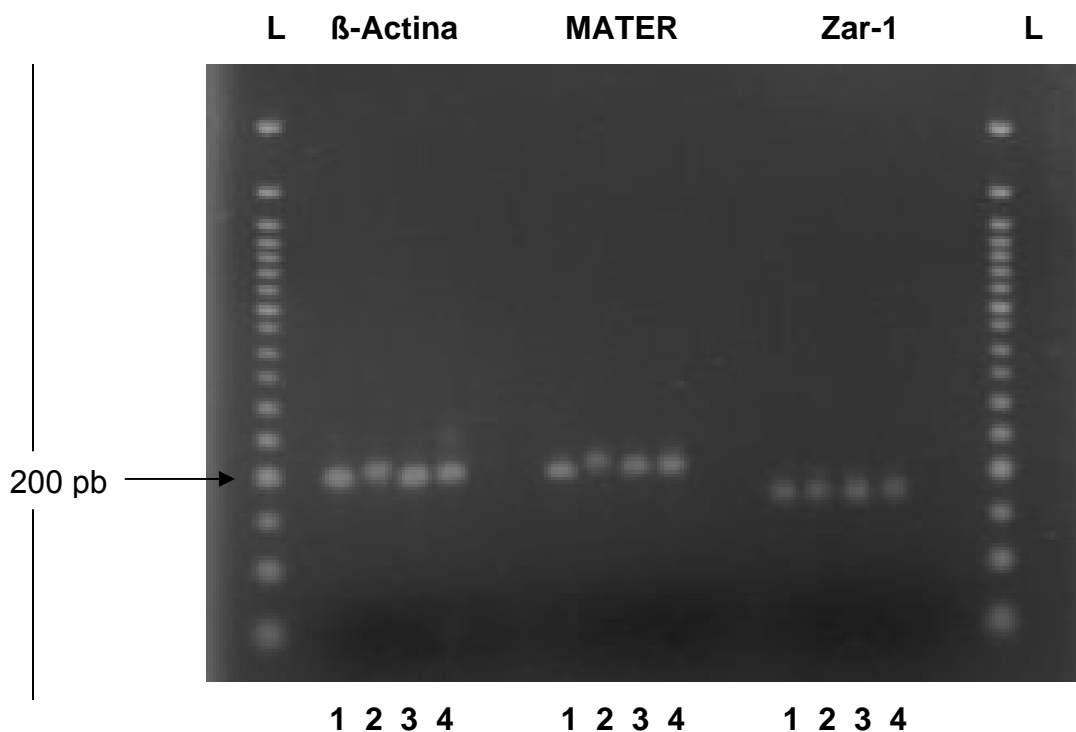


Figura 2: Eletroforese dos fragmentos de cDNA amplificados por PCR em tempo real a partir de *primers* específicos dos genes β -Actina, Mater e Zar-1. A figura mostra Ladder de 50 pb (L) e os genes β -Actina, MATER e Zar-1 nas amostras de oócitos dos grupos MIV (1), mPBS (2), ACB+ (3) e ACB-(4).

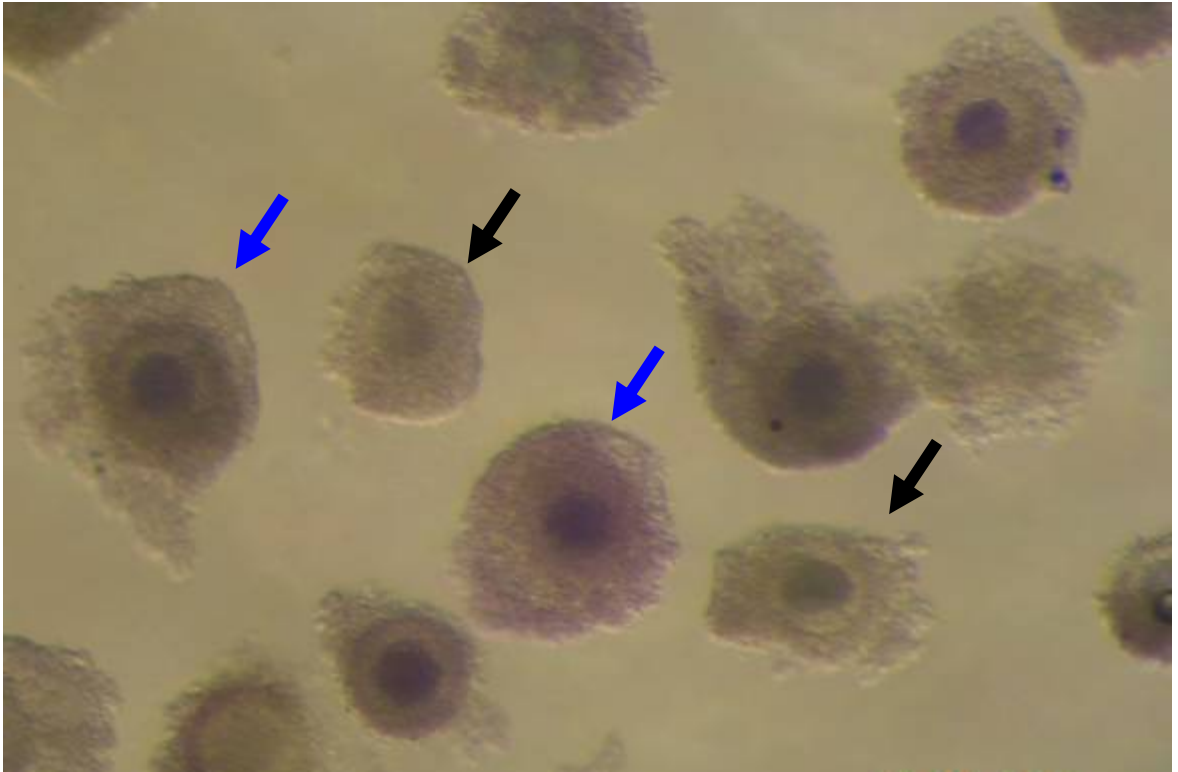


Figura 3: Coloração dos oócitos por ACB após 60 min em condições de incubação. Setas azuis indicam oócitos ACB+ e setas pretas oócitos ACB-.

3.12. Análise estatística

As taxas de clivagem e blastocisto foram analisadas pelo teste Qui-quadrado. As taxas de competência cinética dos zigotos (competência dos zigotos em atingir o estágio embrionário de duas, quatro ou oito células no momento da avaliação da clivagem (48 horas pós fecundação - 48 hpf)) foram analisadas pelo teste não paramétrico Kruskal Wallis. As análises foram realizadas a partir dos resultados obtidos em 8 repetições.

Os valores de expressão gênica relativa ao gene de referência foram avaliados por análise de variância e as médias comparadas pelo Teste-*t* (Student). Diferenças com valor de probabilidade de 0,05 ou menos foram consideradas significativas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Taxa de corados e desenvolvimento *in vitro*

O presente estudo avaliou a competência e a expressão de genes em oócitos bovinos corados com o corante ACB, visando a sua utilização como método de seleção de oócitos de maior qualidade. Esta substância é capaz de determinar a atividade da enzima Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em oócitos, a qual se encontra elevada em oócitos em crescimento, mas com atividade diminuída em oócitos que atingem seu crescimento final (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2003), e que possuem maior competência de desenvolvimento pós-fertilização.

Do total de 530 oócitos submetidos à coloração, 292 (60,37±18,8%) foram classificados como ACB+ e 238 (39,63±18,8%) como ACB-, valores semelhantes aos encontrados por Alm e colaboradores (2005) que encontraram 57,9% ACB+ e 42,1% ACB-. Manjunatha *et al.* (2007) testaram três concentrações de ACB (13µM, 26µM e 39µM) em oócitos de búfalas. Com a menor concentração, apenas 10% dos oócitos foram classificados como ACB+ ao passo que a concentração intermediária de 26µM, este percentual atingiu 57,2% (sem diferir do percentual em concentração de 39µM) dos oócitos submetidos à coloração. No presente experimento, taxas de ACB+ variaram de 32,5% a 88,9% entre as oito repetições analisadas, mostrando uma grande variabilidade entre populações de oócitos oriundos de diferentes baterias quanto ao resultado após o uso do corante.

Os dados referentes à taxa de clivagem e de blastocisto encontram-se dispostos na Tabela 2. No presente experimento, quanto às taxas de clivagem, os grupos controle (MIV) e ACB+ foram semelhantes (P>0,05), porém superiores aos grupos controle de incubação (mPBS) e ACB-, os quais foram semelhantes entre

si ($P>0,05$). Quanto à competência cinética dos zigotos após 48h de fecundação, não foi observada diferença ($P>0,05$) entre os grupos (Tabela 3). Todos os grupos mostraram semelhança na competência dos zigotos em atingir o estágio embrionário de duas, quatro ou oito células no momento da avaliação da clivagem (48 hpf).

Tabela 2: Desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos submetidos à seleção por Azul Cresil Brilhante.

Grupos	Oócitos n	Clivados n (%)	Blastocisto em D8 n (%)
Controle (MIV)	251	164 (65,34) ^a	41(16,33) ^a
Controle (mPBS)	211	105 (49,76) ^b	30(14,22) ^{a,b}
ACB+	292	188 (64,38) ^a	54(18,49) ^a
ACB-	238	122 (51,26) ^b	20(8,40) ^b

^{a,b} Valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna, diferem ($P<0,05$) entre si pelo teste Qui-quadrado.

Tabela 3: Médias e desvios-padrão das taxas de competência cinética dos zigotos 48h após fecundação de oócitos imaturos selecionados por Azul Cresil Brillhante.

Grupos	Oócitos clivados (n)	Taxa de competência cinética (%)		
		2 células	4-7 células	8 células
Controle (MIV)	164	19,63±18,19	61,15±11,65	19,20±12,50
Controle (mPBS)	105	31,91±17,23	53,69±14,37	14,38±13,34
ACB+	188	19,74±9,60	62,08±12,50	18,17±13,69
ACB-	122	19,74±9,60	62,08±12,50	18,17±13,69

Os valores não diferem na mesma coluna ($P>0,05$) entre si pelo teste Kruskal-Wallis.

Semelhante ao presente estudo, Rodriguez-Gonzalez *et al.* (2003) encontraram maiores taxas de clivagem de oócitos de cabras pré-puberes ACB+ (45,3%) do que ACB- (34,9%). Da mesma forma, Bhojwani *et al.* (2007) produzindo embriões bovinos por transferência nuclear, obtiveram taxas de clivagem de 78% e 51% para oócitos ACB+ e ACB-, respectivamente. Todavia, esses autores não verificaram diferença nas taxas de clivagem entre os grupos ACB+ e controle, como neste estudo. Por outro lado, os resultados apresentados nesse estudo diferem dos achados de Alm *et al.* (2005). Esses autores, trabalhando com oócitos bovinos, verificaram que os grupos controle (MIV), controle de incubação (mPBS), ACB+ e ACB-, foram semelhantes apresentando 67,4; 79,4; 72,8 e 71,6% respectivamente, sugerindo que as estruturas coradas por ACB não tiveram melhor taxa de clivagem após a fecundação *in vitro*. No entanto, verificou-se neste trabalho, que o grupo mPBS foi semelhante ao grupo ACB- e inferior a ACB+ e controle (MIV). Da mesma forma, oócitos de búfalas do grupo controle de incubação apresentaram semelhantes taxas de clivagens quando comparados ao grupo ACB- (MANJUNATHA *et al.*, 2007). Provavelmente, a manutenção dos CCOs em mPBS sob condições de incubação por períodos

prolongados (mais de 1h) seja capaz de comprometer a qualidade do oócito, visto que, apesar de Alm *et al.* (2005) não terem verificado diferença na porcentagem de oócitos mPBS que atingiram MII quando comparado a oócitos controle e ACB+, do total de oócitos mantidos em mPBS antes da maturação, 17,5% apresentaram-se degenerados. Tais achados demonstram provável influência negativa durante as etapas iniciais de desenvolvimento, quando oócitos são mantidos por 60 min em mPBS sob incubação. Neste sentido, oócitos ACB- são menos competentes do que ACB+ por apresentarem menor diâmetro (PUJOL *et al.*, 2005) somado a incubação por 1h em mPBS. E, provavelmente, a maior competência de oócitos ACB+ sobrepuja os efeitos negativos da incubação.

Tem-se sugerido que a coloração por ACB seleciona oócitos imaturos de maior competência (ALM *et al.*, 2005) para a fecundação *in vitro*, o que poderia implicar também em maior taxa de clivagem, contudo essa relação entre competência e clivagem pode não ser direta. Rizos *et al.* (2002) não encontraram diferença na taxa de clivagem entre oócitos com diferentes competências de desenvolvimento (maturados *in vitro* ou *in vivo*), porém com diferentes taxas de blastocistos. Isso sugere que a competência do oócito interfere na produção de embriões, mesmo sem necessariamente interferir na clivagem. Segundo Orsi e Reischl (2007), os sistemas de co-cultivo atuais, não levam em conta as mudanças de requerimento dos embriões e células somáticas ao longo do desenvolvimento *in vitro*. Neste sentido, alta taxa de clivagem não é necessariamente valor indicativo de elevadas taxas de embriões em estágio de blastocisto.

Observou-se que os grupos controle e ACB+ produziram maiores taxas de blastocistos baseado no número de oócitos do que o grupo ACB-, enquanto o grupo controle mPBS não diferiu dos demais grupos (Tabela 1). Como esperado, o uso do corante detectou duas populações de oócitos com diferentes potenciais de desenvolvimento até estágio de blastocisto. A maior atividade da enzima G6PDH, encontrada em oócitos ainda em crescimento, degradou o corante tornando-os incolores. Oócitos menores e incolores respondem por menores taxas de blastocisto (ALM *et al.*, 2005).

Os valores das taxas de blastocisto no presente experimento não apresentaram diferença entre os grupos ACB+ e controle. Esses resultados contradizem os de diversos autores que afirmaram haver maximização dos

resultados da PIV de embriões quando do uso do corante, comparado aos oócitos não submetidos à coloração. Oócitos ACB+ de cabras pré-pubescentes, vacas, novilhas, camundongas e búfalas apresentam maiores taxas de blastocisto que o grupo controle (RODRIGUEZ-GONZALEZ *et al.*, 2003; ALM *et al.*, 2005; PUJOL *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2007; MANJUNATHA *et al.*, 2007). Porém, Katska-Ksiazkiewicz *et al.* (2007) ao testar o corante na seleção de oócitos de cabras não observaram diferença na produção de blastocistos entre o grupo ACB+ (13,3%) e o controle (19,1%), não submetido à coloração, semelhante ao observado no presente estudo. Verificaram que oócitos de ambos os grupos (ACB+ grau I e controle) exibiram maior competência de desenvolvimento que aqueles ACB- grau I e ACB+ e ACB-, ambos de grau II. Outro resultado destacado por esses autores é que oócitos grau II, independente da coloração, não apresentaram diferença na competência de desenvolvimento. Além disso, no estudo, 3,6% do pool de CCOs grau I apresentaram sinais de degeneração do citoplasma após coloração por ACB. Provavelmente, alguns oócitos podem ser mais sensíveis ao corante e então apresentarem sinais apoptóticos. O estudo de Katska-Ksiazkiewicz *et al.* (2007) evidencia a importância da avaliação morfológica, mesmo para uso com o corante, uma vez que oócitos corados classificados como grau I possuem maior competência do que oócitos corados de grau II. Isso significa que uma maior presença de oócitos de grau II em população de oócitos corados pode reduzir as taxas de desenvolvimento dessa população corada pelo ACB. No presente experimento, foram submetidos ao corante oócitos graus I e II, o que pode ter contribuído para a inexistência de diferença de resultado entre o grupo ACB+ e grupo controle.

O resultado do presente experimento mostra que ambas as seleções, morfológica combinada ao corante (grupo ACB+) e apenas pela morfologia (grupo controle) podem ser utilizadas, gerando resultados semelhantes quanto à produção de embriões bovinos. Tais achados corroboram os de Opiela *et al.* (2008), pois estes autores também não obtiveram maiores taxas de blastocistos para oócitos ACB+ do que o grupo controle. No entanto, oócitos ACB- responderam pela menor taxa de blastocistos, assim como neste trabalho.

Outros fatores podem também influenciar a eficiência do corante. Wu *et al.* (2007) destacaram que, apesar do corante ser um método eficiente na seleção de

oócitos competentes em camundongos, os resultados nesta espécie variaram em função do diâmetro do oócito, maturidade sexual do animal e estímulo a gonadotrofinas. No trabalho, 95% dos oócitos pequenos (<60 µm) foram classificados como ACB+. Mesmo sendo espécie distinta da utilizada neste trabalho e não sendo conveniente a comparação quanto ao diâmetro de oócitos, tal achado levanta a hipótese de que a população de oócitos ACB+ pode conter oócitos de pequeno diâmetro, ainda incompetentes para a PIV de embriões. Levando-se em conta a maturidade sexual em bovinos, a coloração por ACB foi avaliada por Tagawa *et al.* (2007). Oócitos obtidos por aspiração folicular guiada por ultra-som em novilhas pré-púberes não apresentaram diferença nas taxas de clivagem e blastocisto entre os ditos ACB+ e ACB-. Os resultados evidenciaram que a seleção de oócitos imaturos pelo corante foi efetiva apenas em vacas, mas não em fêmeas pré-púberes de 9 meses.

Ericsson *et al.* (1993) distinguiram três intensidades de coloração por ACB. Oócitos azul escuro, intermediário e claro apresentaram resultados diferentes em relação às taxas de maturação, penetração espermática, polispermia e formação dos prónucleos. Oócitos classificados por coloração mais intensa, demonstraram maiores taxas de maturação e desenvolvimento dos prónucleos femininos e masculinos. Neste sentido, como o presente experimento classificou oócitos como ACB+ aqueles que apresentaram qualquer intensidade de coloração, é possível que os resultados tenham sido influenciados pela presença de oócitos pouco corados e que apresentam menor potencial de desenvolvimento.

Corroborando os achados em cabras (KATSKA-KSIAZKIEWICZ *et al.*, 2007) e bovinos (OPIELA *et al.*, 2008), o presente trabalho não verificou otimização na seleção morfológica de oócitos imaturos combinada a seleção por ACB quando comparada à seleção morfológica (quando utilizada unicamente). No entanto foram diferenciadas duas populações de oócitos: ACB+ e ACB- de maior e menor competência de produção de embriões *in vitro* respectivamente. A produção de blastócitos no grupo ACB+ apresentou coeficiente de variação (40,24%), inferior aos demais grupos (65,31%, 74,52%, e 89,97% para MIV, mPBS e ACB- respectivamente), mostrando uma menor variabilidade entre as repetições no grupo ACB+. Este achado abre possibilidades para que as causas biológicas de variação, neste caso o oócito, em trabalhos de pesquisa seja reduzida. Roca *et*

al., (1998) buscando padronizar e otimizar o teste de habilidade de penetração de espermatozoides de varrões, observaram que a variação entre testes de penetração homóloga pode ser reduzida quando os oócitos são selecionados por ACB.

A heterogeneidade de oócitos receptores para a técnica de transferência nuclear de célula somática (TNCS) pode responder por variação entre os resultados obtidos, visto que, fatores fundamentais na interação núcleo-citoplasma podem variar afetando a reprogramação nuclear (CAMPBELL *et al.*, 2005). Aston *et al.* (2006) encontraram resultados inferiores na produção de embriões e em taxas de gestação para embriões bovinos produzidos por TNCS a partir de oócitos de novilhas comparados aos de vacas, relacionando assim o sucesso da técnica com competência oocitária. Testando o ACB, Bhojwani *et al.* (2007) verificaram que oócitos ACB+ apresentaram maiores taxas de blastocisto por TNCS e concluíram que a coloração dos CCOs pode ser usada para selecionar oócitos mais competentes.

As baixas taxas evidenciadas no presente trabalho, podem ser explicadas pelo baixo nível nutricional dos animais. O período experimental se deu entre os meses de agosto a outubro e o ano foi marcado por forte seca, comprometendo atividade ovariana das fêmeas abatidas que foram utilizadas para obtenção dos ovários. Costa *et al.* (2006) trabalhando em mesma região e em semelhantes condições de laboratório observaram variação sazonal na produção de blastocistos. Os meses de setembro e outubro responderam pelas menores taxas de blastocisto ao longo do ano. O período entre os meses de junho a setembro é marcado por forte estiagem em boa parte do Brasil, comprometendo o cultivo de espécies forrageiras afetando a nutrição de animais criados a pasto. Fernandes *et al.* (2001) encontraram maior percentual de oócitos viáveis em fêmeas *Bos Indicus* na época chuvosa (35,6%) que na época seca do ano (19,6%). Diversos fatores podem explicar tais resultados, dentre os quais, os baixos níveis de hormônios gonadotrópicos em períodos de restrição alimentar. Rasby *et al.* (1992) observaram correlação negativa entre a concentração de GnRH na eminência média do hipotálamo com a condição corporal, porcentagem e total de gordura na carcaça de vacas Hereford. Concluíram então que a redução da secreção de LH associada à queda de gordura corporal em vacas pode ser devido a reduzida

liberação de GnRH pelo hipotálamo. Neste contexto, baixos níveis de hormônios gonadotrópicos (devido a período de restrição alimentar) podem ter comprometido a competência dos oócitos para a PIV.

4.2. Expressão gênica

Os resultados referentes à expressão gênica estão dispostos na Tabela 4. Apesar da primeira etapa do trabalho ter demonstrado que o corante é capaz de selecionar duas populações de oócitos com diferente competência para a PIV (ACB+ e ACB-), a análise de expressão relativa dos transcritos MATER e Zar-1 por PCR real time em oócitos imaturos após coloração, não apresentou diferença.

Genes de efeito materno produzem RNAm ou proteínas que se acumulam no oócito ao longo da oogênese e são importantes para as primeiras clivagens até que a ativação do genoma embrionário ocorra. Tong *et al.* (2000) demonstraram que a proteína MATER, produzida a partir do genoma materno, é essencial para o desenvolvimento embrionário além do estágio de duas células em ratas. Fêmeas que tiveram o gene MATER nocauteado apresentaram todos os estágios da foliculogênese ovariana, ovularam normalmente após estímulo exógeno de gonadotrofinas, foram fertilizadas *in vivo* normalmente e o número e a morfologia de zigotos e embriões de duas células, foram iguais àqueles oriundos de fêmeas normais. No entanto embriões coletados três ou quatro dias após cobertura, apresentaram-se ainda no estágio de duas células e alguns demonstrando sinais iniciais de degeneração. Assim, a proteína MATER é requerida para o desenvolvimento inicial de embriões nesta espécie. Por apresentar localização em diversas organelas, a MATER pode estar envolvida em diferentes atividades celulares. Sua presença em mitocôndrias, sugere envolvimento no metabolismo citoplasmático e distúrbios na função dessas organelas podem comprometer a produção de ATP e induzir alterações no desenvolvimento embrionário (TONG *et al.*, 2004).

Tabela-4: Médias e desvios padrão de expressão relativa dos transcritos MATER e Zar-1 em oócitos imaturos selecionados por Azul Cresil Brilhante.

Grupos	Gene	
	MATER	Zar-1
Controle	0,63±0,16	0,69±0,28
Controle mPBS	0,12±0,20	1,01±0,28
ACB+	0,25±0,16	0,58±0,28
ACB-	0,17±0,16	0,38±0,28

Os valores não diferem na mesma coluna ($p > 0,05$) entre si pelo Teste-*t* (Student).

Em bovinos, Pennetier *et al.* (2004) verificaram queda de 72% no nível de expressão do gene MATER durante a maturação, ao passo que tais níveis permaneceram constantes durante a fecundação. A localização da proteína por imunohistoquímica foi observada em folículos primários sendo crescente seu acúmulo ao longo do desenvolvimento dos folículos pré-antrais e antrais. Os autores sugerem que a proteína pode ser sintetizada apesar de não ser requerida ainda nestes estágios iniciais. Talvez a repressão desses genes fosse mais complexa para a célula que suportar mínima expressão.

O gene Zar-1 também possui importância na transição do genoma embrionário. Wu *et al.* (2003) observaram que camundongos que tiveram este gene nocauteado, apresentaram embriões estacionados na fase de zigoto e alguns mostrando sinais de degeneração. O transcrito Zar-1 em oócitos bovinos persiste no início do desenvolvimento embrionário, mas seu padrão de expressão não é reativado após transição do genoma materno-embrião (PENNETIER *et al.*, 2004).

Foi demonstrado por Fair *et al.* (1995) que oócitos bovinos apresentam intensa síntese de RNA até atingirem seu crescimento final. Alguns autores encontraram maior diâmetro médio de oócitos ACB+ do que ACB- em bovinos

(PUJOL *et al.*, 2004) suínos (ROCA *et al.*, 1998) assim como maior volume foi verificado em oócitos ACB+ desta mesma espécie (SHOURBAGY *et al.*, 2006). Neste contexto, espera-se que oócitos ACB+ possam apresentar maior abundância de transcritos para diversas proteínas envolvidas na aquisição da competência do gameta.

No presente experimento, não foi possível também relacionar a coloração por ACB como marcador da abundância de transcritos envolvidos da transição do genoma embrionário (MATER e Zar-1). Ao avaliar a expressão dos genes Hsp 70.1, envolvido em processos de resposta ao estresse celular (KAWARSKY e KING 2001) Zar -1 e MATER, Adona *et al.* (2008) não encontraram diferença na quantificação relativa desses transcritos entre oócitos imaturos (em estágio de VG) e em MII. É possível que o estoque de RNAm desses genes já tenham se estabelecido em oócitos a partir de folículos de 3 mm, desta maneira a coloração por ACB não seria capaz de distinguir diferença no padrão dos transcritos.

Avaliando a expressão de diversos genes entre oócitos ACB+ e ACB-, Torner *et al.* (2008) verificaram que oócitos ACB+ apresentaram-se ricos em genes reguladores de transcrição (SMARCA 5), ciclo celular (NASP), biossíntese de proteínas (RPS247A e EEF1A1). Por outro lado, oócitos ACB- tiveram maior nível de genes envolvidos em síntese de ATP (ATP5A1), transportadores de elétrons (FL405), ligadores de íons cálcio (S100A10) e fator de crescimento (BMP-15).

Talvez a presença dos transcritos nos níveis verificados não estaria associada à pela diferença observada no desenvolvimento *in vitro*. Como a coloração por ACB distinguiu duas populações de oócitos com diferentes competências, sugere-se que a quantidade relativa de transcritos desses genes presentes nos oócitos imaturos tenha menor importância no desenvolvimento de embriões bovinos fecundados *in vitro*. Assim, quantidades reduzidas desses transcritos podem ser suficientes para exercerem sua função. Sabe-se hoje que mais de 10000 genes são expressos em oócitos e embriões, e provavelmente transcritos de outros genes podem ser tão importantes quanto ZAR-1 e MATER para o desenvolvimento posterior do oócito. Provavelmente outros fatores, ligados mais diretamente a seleção bioquímica respondem pela diferença de potencial de desenvolvimento entre oócitos ABC+ e ACB-.

5. CONCLUSÕES

A seleção de oócitos imaturos pelo corante ACB foi capaz de selecionar populações de oócitos com diferente potencial para a PIV.

A seleção de oócitos imaturos pelo corante ACB se assemelhou a seleção morfológica convencional em termos de produção embrionária *in vitro*.

A coloração de oócitos imaturos por ACB não possui relação direta com a abundância dos transcritos MATER e Zar-1, envolvidos na transição do genoma embrionário.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRU, F.; BEBBERE, D.; SUCCU, S.; TORE, S.; BOGLIOLO, L.; FOIS, S. Expression pattern of the maternal factor zygote arrest 1 (zar1) gene in ovine oocytes and pre-implantation embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, v.19, p.245, 2006.

ALI, A.; COENEN, K. ; BOUSQUET, D. ; SIRARD, M-C. Origin of bovine follicular fluid and its effect during *in vitro* maturation on the developmental competence of bovine oocytes. v. 62, p. 1596-1606, 2004.

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.

ASTON, K.I.; LI, G-P.; HICKS, B.A.; SESSIONS, B.R.; PATE, B.J.; HAMMON, D.S.; BUNCH, T.D.; WHITE, K.L. The developmental competence of bovine nuclear transfer embryos derived from cow versus heifer cytoplasts. *Animal Reproduction Science*, v.95, p.234-243, 2006.

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.

BHOJWANI S; ALM, H.; TORNER, H., KANITZ, W., POEHLAND, R. Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances

blasctocyst development rate after bovine nuclear transfer. *Theriogenology*, v. 67, p.341-345, 2007.

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.

BREVINI, T.A.L.; CILLO, F.; COLLEONI, S.; LAZZARI, G.; GALLI, C.; GANDOLFI, F. Expression pattern of the maternal factor zygote arrest 1 (Zar1) in bovine tissues, oocytes, and embryos. *Molecular Reproduction and Development*, v.69, p.375-380, 2004.

CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; RAMOS, A.A.; SERAPIÃO, R.V.; W.F. de SÁ; FERREIRA, A.M.; GUIMARÃES, M.F.M.; VALE FILHO, V.R. Developmental competence and expression of Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. *Theriogenology*, v.68, p. 626-632, 2007.

CAMARGO, L.S.A., VIANA, J.H.M. SÁ, W.F., FERREIRA A.M., RAMOS, A.A, VALE FILHO, V.R. Factors influencing *in vitro* embryo production. *Anim. Reprod.*, v.3, n.1, p.19-28, 2006.

CAMPBELL, K.H.S.; ALBERIO, R.; CHOI, I.; FISHER, P.; KELLY, R.D.W.; LEE, J-H.; MAALOUF, W. Cloning: Eight Years After Dolly. *Reproduction Domestic Animals*. v.40, p.256-268, 2005.

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.

COSTA, D.D.; PEREIRA, M.M.; DIAS, L.O.; SERAPIÃO, R.V.; POLISSENI, J.; FOLHADELLA, I.M.; RAMOS, A.A.; CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F. Efeito sazonal sobre a produção de embriões bovinos produzidos *in vitro* em região tropical. XXIX Semana de Biologia e XII Mostra de Produção Científica - UFJF Diretório Acadêmico de Ciências Biológicas - Walter Machado Couto. 2006.

CUI, X-S.; JEONG, Y-J.; LEE, H-Y.; CHEON, S-H.; KIM, N-H. Fetal bovine serum influences apoptosis and apoptosis-related gene expression in porcine parthenotes developing *in vitro*. *Reproduction*, v.127, p.125-130, 2004.

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.

DIELEMAN, S.J.; HENDRIKSEN, P.J.; VIUFF, D. THOMSEN, P.D.; HYTTEL, P.; KNIJN H.M. Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of preimplantation embryos. *Theriogenology*, v.57, p.5-20, 2002.

DODE, M.A.N. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.34, supl.1, p.115-130,2006.

DODE, M.A.N.; RUMPF, R. Produção *in vitro* de embriões – eficiência, limitações e perspectivas futuras: visão da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Anais do Workshop sobre embriões bovinos produzidos *in vitro*: perspectivas de utilização e possíveis impactos na pecuária brasileira. Documentos 88, Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, p.14-26, 2002.

DONNINSON, M.; PFEFFER, P. L. Isolation of genes associated with developmentally competent bovine oocytes and quantification of their levels during development. *Biology of Reproduction*, v.71, p.1813-1821, 2004.

DRINCOURT, M.A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implication for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, v.55, p.1211-1239, 2001.

ERICSSON, S.A.; BOICE, M.L.; FUNAHASHI, H.; DAY, B.N. Assessment of porcine oocytes using Brilliant Cresyl Blue. *Theriogenology*, v.39, p.214, 1993.

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.

FERNANDES, C.E.; DODE, M.A.N.; GODOY, K.; RODOVALHO, N. Efeito estacional sobre características ovarianas e produção de oócitos em vacas *Bos indicus* no Mato Grosso do Sul. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.*, v.38, p.131-135, 2001.

GHANEM, N.; HOLKER, M.; RINGS, F.; JENNEN, D.; THOLEN, E.; SIRARD, M-A.; TORNER, H.; KANITZ, W.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Alterations in transcript abundance of bovine oocytes recovered at growth and dominance phases of the first follicular wave. *BMC Developmental Biology*, v.7, p 1-19, 2007.

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.

GINTHER, O. J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Animal Reproduction Science*, v.60, p.61-79, 2000.

GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M.; SUZUKI, D.T.; MILLER J.H. Introdução a genética. Rio de Janeiro: Ed.Guanabara Koogan, p.1-23, 2006.

HAN, Z-B.; LAN, G-C.; WU, Y-G.; HAN, D.; FENG, W-G.; WANG, J-Z.; TAN, J-H. Interactive effects of granulosa cell apoptosis, follicle size, cumulus–oocyte complex morphology, and cumulus expansion on the developmental competence of goat oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Reproduction*, v.132, p. 749-758, 2006.

HANGEMANN, L. J. Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. *Theriogenology*, v.51, p449-459, 1999.

HAWK, H.W.; WALL, R.J. Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro*-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology*, v. 41, p.1571-1583,1994.

HENDRIKSEN, 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.

HYTTEL, P.; GJORRET, J.O.; VAJTA, G.; ALEXOPOULOS, N.I.; LEWIS, I.; TROUNSON, A.; VIUFF, D.; LAURINCIK, J.; MULLER, M.; TVEDEN-NYBORG, P.; THOMSEN, P. D. Morphological assessment of preimplantation embryo quality in cattle. *Reproduction Supplement*, v. 61, p. 103-116, 2003.

HUMBLOT, P.; HOLM, P.; LONERGAN, P.; WRENZYCKI. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.63, p.1146-1166, 2005.

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.

JIMENEZ–MACEDO, A.-R.; PARAMIO- M.T.; ANGUITA, B.; MORATO, R.; ROMAGUERA, R.; MOGAS, T.; IZGUIERDO, D. Effect of ICSI and embryo biopsy on embryo development and apoptosis according to oocyte diameter in prepubertal goats. *Theriogenology*, v. 67, p.1399–1408, 2007.

KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Effects of oocytes quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos.

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.

LECHNIAK, D.; KACZMAREK, D.; STANISLAWSKI, D.; ADAMOWICK, T. The ploidy of *in vitro* matured bovine oocytes is related to the diameter. *Theriogenology*, v. 57, p1303-1308, 2002.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica. 2º Ed. São Paulo, 1995.

LEVESQUE, J.T.; SIRARD, M.A. Proteins in oocytes from calves and adult cows before maturation: relationship with their developmental capacity. *Reproduction Nutrition Development*, v.34, p.133-139, 1994.

LEQUARRE, A-S.; VIGENRON, C.; RIBAUCCOUR, F.; HOLM, P.; DONNAY, I.; DALBIES-TRAN, R.; CALLESEN, H.; MERMILLOD, P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology*, v.63, p.841-859. 2005.

LONERGAN, P.; FAIR, T. *In vitro*-produced bovine embryos—Dealing with the warts. *Theriogenology*, v. 69, p.17-22, 2008.

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

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.

KAWARSKY, S.J.; KING, W.A. Expression and localisation of heat shock protein 70 in cultured bovine oocytes and embryos. *Zygote*, v.9, p. 39-50. 2001.

KRISHER, R.L.; LANE, M.; BAVISTER, B.D. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultures in semi-defined and defined culture media. *Biology of Reproduction*, v.60, p1345-1352, 1999.

MADISON, V.; AVERY, B.; GREVE, T. Selection of immature bovine oocytes for developmental potential *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, v.27,p.1-11, 1992.

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.

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, n. 55, p.911-922, 2001.

NEMCOVA, L.; MACHATKOVA, M.; HANZALOVA, K.; HORAKOVA, J.; KANKA, J. Gene expression in bovine embryos derived from oocytes with different developmental competence collected at the defined follicular developmental stage. *Theriogenology*, v.65, p.1254-1264, 2006.

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

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* (2008), doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.11.001.

ORSI, N.M.; REISCHL, J.B. Mammalian embryo co-culture: Trials and tribulations of a misunderstood method. *Theriogenology*, v.67, p.441-458, 2007.

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.

PENNETIER, S.; PERREAU, C.; UZBEKOVA, S.; THÉLIE, A.; DELALEU, B.; MERMILLOD, P.; TRA, P.R. MATER protein expression and intracellular localization throughout folliculogenesis and preimplantation embryo development in the bovine. *BMC Developmental Biology*, v.26, p1-9, 2006.

PENNETIER, S.; UZBEKOVA, S.; PERREAU, C.; PAPILLIER, P.; MERMILLOD, P.; TRAN, P.R. Spatio-Temporal Expression of the Germ Cell Marker Genes MATER, ZAR1, GDF9, BMP15, and VASA in Adult Bovine Tissues, Oocytes, and Preimplantation Embryos. *Biology of Reproduction*, v. 71, p.1359–1366, 2004.

PEREIRA, M.M.; BATISTA, R.I.T.; WOHLRES-VIANA, S.; BOITÉ, M.C.; SERAPIÃO, R.V.; POLISSENI, J.; IGUMA, L.T.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M. Relação entre qualidade morfológica de complexos *cumulus*-oócitos bovinos e potencial de desenvolvimento *in vitro*. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.35, supl. 3, p.1182, 2007.

PICTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocytes growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 145, p.27-37, 1998.

POMAR, F.J.R.; TEERDS, K.J.; KIDSON, A.; COLENBRANDER, B.; THARASANIT, T.; AGUILAR, B.; ROELEN, B.A.J. Differences in the incidence of apoptosis between *in vivo* and *in vitro* produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology*, v.63, p.2254-2268, 2005.

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.

RASBY, R.J.; WETTEMANN, R.P.; HARMS, P.G.; LUSBY, K.S.; WAGNER, J.J. GnRH in the infundibular stalk-median eminence is related to percentage body fat in carcasses of beef cows. *Domestic Animal Endocrinology*, v.9, p.71-76, 1992.

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.

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.

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.

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.

SCHULTZ, R.M. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Human Reproduction Update*, v. 8, p.323-331,2002.

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.

STEEVES, T.E.; GARDNER, D.K. Metabolism of glucose, piruvate, and glutamine during the maturation of oocytes derived from pre-pubertal and adult cows. *Molecular Reproduction Development*. v.54, p.92-101. 1999.

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.

TAGAWA, M.; MATOBA, S.; OKADA, M.; METOKI, K.; IMAI, K. Developmental competence of oocytes selected by the brilliant cresyl blue staining in prepubertal and adult cattle. *Reproduction Fertility and Development*, v.19, p.273, 2007.

TIAN, W-N.; BRAUNSTEIN, L.D.; PANG, J.; STUHLMEIER, K.M.; XI, Q-C. Importance of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase activity for cell growth. *The journal of biological chemistry*, v. 273, p. 10609–10617, 1998.

TONG, Z-B.; GOLD, L.; DE POL, A.; VANEVSKI, A; DORWARD, H.; SENA, P.; PALUMBO, C.; BONDY, C.A.; NELSON, L.M. Developmental expression and subcellular localization of mouse MATER, an oocyte-specific protein essential for early development. *Endocrinology*, v.145, p. 1427-1434, 2004.

TONG, Z-B.; GOLD, L.; PFEIFER, K.E.; DORWARD, H.; LEE, ERIC.; BONDY,C.A.; DEAN, J.; NELSON, L.M. Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nature Genetics*, v. 26, p.267-268, 2000.

TORNER, H.; GHANEM, N.; AMBROS, C.; HOELKER, M.; PHATSARA, C.; ALM, H.; KANITZ, W.; SIRARD, M.A.; SCHELLANDER,K.; TESFAYE,D. Molecular and subcellular characterization of oocytes screened for their developmental competence based on G6PDH activity. *Reproduction, Fertility and Developmet*, v.20, p.207, 2008.

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.

VANDAELE, L.; MATEUSEN, B. MAES, D. G. D.; DE KRUIF. A.; SOOM, A.V. Temporal detection of caspase-3 and -7 in bovine *in vitro* produced embryos of different developmental capacity. *Reproduction*, v.133, p.709-718, 2007.

VASSENA, R.; MAPLETOFT, R.J.; ALLODI, S.; SINGH, J.; ADAMS, J.P. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology*, v. 60, p.923-932, 2003.

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. Cenário atual da transferência de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* no Brasil e no Mundo. *O Embrião*, n. 29, p.4-7, 2006.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.35, p.915-924, 2007.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.,FERNANDES, C.A.C.;MARQUES JUNIOR, A.P. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle . *Animal Reproduction Science*, v.84, p.1-12, 2004

WARZICH, E.; WRENZYCKI, C.; PEIPPO,J.; LENCHNIAK, D. Maturation medium supplements affect transcript level of apoptosis and cell survival related genes in bovine blastocysts produced *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*, v.74, p.280-289, 2007.

WILKINSON, R.F; MING, R.; ANDERSON, B.; BUNCH, T.D.; WHITE, K.L. The use of neural networks in developing novel embryo culture media-formulations. *Theriogenology*, v. 45, p. 41–9, 1996.

WHITTINGHAM, D.G. Culture of mouse ova. *Journal of reproduction fertility*, v.14, p.7-21, 1971.

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.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology*,v.68S, p.S77-S83, 2007.

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.

WU, X.; VIVEIROS,M.M.; EPPIG,J.J.; BAI,Y.; Zygote arrest 1 (*Zar1*) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. *Nature Genetics*, v.33, p.187-191, 2003.

YANG, M,Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, v.70, p.159-169, 2002.

YANG, X.; KUBOTA, C.; SUZUKI, H.; TANEJA, M.; BOLS, P.E.J.;PRESICCE, G.A. Control of oocyte maturation in cows-biological factors. *Theriogenology*, v.49, p471-472, 1998.

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.

ZHANG, P.; KERKELA, E.; SKOTTMAN, H.; LEVKOV, L.; KIVINEN, K.; LAHESMAA, R.; HOVATTA, O.; KERE, J. Distinct sets of developmentally regulated genes that are expressed by human oocytes and human embryonic stem cells. *Fertility and Sterility*, v.87, p.677-690, 2007.