

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ESTIMULAÇÃO OVARIANA, RECUPERAÇÃO E  
MATURAÇÃO DE OÓCITOS DE VEADO-CATINGUEIRO  
(*Mazama gouazoubira*)**

Luciana Diniz Rola  
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Março de 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ESTIMULAÇÃO OVARIANA, RECUPERAÇÃO E  
MATURAÇÃO DE OÓCITOS DE VEADO-  
CATINGUEIRO (*Mazama gouazoubira*)**

Luciana Diniz Rola

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

Co-orientadora: Dra. Eveline dos Santos Zanetti

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Março de 2013

R744e Rola, Luciana Diniz  
Estimulação ovariana, recuperação e maturação de oócitos de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) / Luciana Diniz Rola. -- Jaboticabal, 2013  
xvii, 57 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013  
Orientador: José Maurício Barbanti Duarte  
Co-orientadora: Eveline dos Santos Zanetti  
Banca examinadora: Rosana Nogueira de Moraes, Lawrence Charles Smith  
Bibliografia

1. Cervídeos. 2. Oócitos. 3. *Mazama gouazoubira*. 4. Maturação *in vitro*. 5. PIVE. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:639.111.1

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
CAMPUS DE JABOTICABAL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** ESTIMULAÇÃO OVARIANA, RECUPERAÇÃO E MATURAÇÃO DE OÓCITOS DE VEADO-CATINGUEIRO (*Mazama gouazoubira*)

**AUTORA:** LUCIANA DINIZ ROLA

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. JOSE MAURICIO BARBANTI DUARTE

**CO-ORIENTADORA:** Profa. Dra. EVELINE DOS SANTOS ZANETTI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. EVELINE DOS SANTOS ZANETTI

Pós-Doutoranda / Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. ROSANA NOGUEIRA DE MORAIS  
Universidade Federal do Paraná / Curitiba/PR

Prof. Dr. LAWRENCE CHARLES SMITH

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 28 de fevereiro de 2013.

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**Luciana Diniz Rola** - Nascida na cidade de São Paulo em 12 de março de 1988, iniciou o curso de graduação em Medicina Veterinária na Universidade Estadual Paulista “Dr. Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, em março de 2006. Em 2007 ingressou como estagiária no Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), onde desenvolveu dois trabalhos de iniciação científica como bolsista da FAPESP, sob orientação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte e co-orientação da Dra. Eveline dos Santos Zanetti em 2007 e 2009. Em 2008 obteve bolsa de iniciação científica do PIBIC, participando do projeto linfoma, sob a orientação do Prof. Dr. Áureo Evangelista. Em março de 2011 iniciou o mestrado em Medicina Veterinária (área de concentração Reprodução Animal), sob orientação do Prof. Dr. Maurício Barbanti e co-orientação da Dra. Eveline Zanetti, com bolsa contemplada pela FAPESP.

***“Eu não tenho muitas respostas. O que eu tenho é fé.  
E uma vontade bonita, toda minha, de crescer.”***

Ana Jácomo

# *D*edico

**Ao meu avó Manuel Marques Rola (*in memoriam*)**

## AGRADECIMENTOS

**“Nas nossas vidas diárias,  
devemos ver que não é a felicidade que nos faz agradecidos,  
mas a gratidão é que nos faz felizes”**

*Albert Clarke*

Neste momento eu gostaria muito de agradecer aqueles que me fazem mais feliz, afinal, realmente é muito bom ter a quem agradecer!

Nem de longe esse trabalho é mérito só meu. Há muitas pessoas que contribuíram para este trabalho e para minha formação.

**“A suprema arte do professor é despertar a alegria na expressão criativa do conhecimento, dar liberdade para que cada estudante desenvolva sua forma de pensar e entender o mundo, assim criamos pensadores, cientistas e artistas que expressarão em seus trabalhos aquilo que aprenderam com seus mestres.”**

*Albert Einstein*

Meus agradecimentos aos orientadores José Maurício Barbanti Duarte e Eveline dos Santos Zanetti. Obrigada por toda dedicação, paciência, pelos conhecimentos transmitidos e pela forma de ensinar, que sempre me causaram admiração, respeito e me instigaram a continuar a trilhar pelo caminho acadêmico. A contribuição de vocês na minha vida é imensurável.

Muito obrigada aos colaboradores deste trabalho: Ao pessoal do laboratório de reprodução - Maite del Collado, Naiara Saraiva Zoccal e Roberta Cordeiro Gaspar, a anestesista Ana Paula Gering, ao pessoal do US - Marcus Feliciano, Maria Emília Oliveira e Leandro Nassar Coutinho, a banca de qualificação - Naiara Zoccal Saraiva e Lindsay Unno Gimenes e a banca de defesa - Rosana Nogueira de Moraes e Lawrence Charles Smith.

**“Na vida, não existem soluções.  
Existem forças em marcha: é preciso criá-las e, então,  
a elas seguem-se as soluções.”**

*Antoine de Saint-Exupéry*

Aos integrantes e ex-integrantes do nosso grupo de pesquisa, o Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos “com Emoção” (NUPECCE). Obrigada a esse grupo tão maravilhoso, que permite que a união torne os nossos objetivos mais possíveis, e a convivência diária tão agradável!

**“Se quiser falar ao coração dos homens, há que se contar uma história. Dessas onde não faltam animais, ou deuses e muita fantasia. Porque é assim – suave e docemente que se despertam consciências.”**

*Jean de La Fontaine*

Meu “muito obrigada” aos animais, que ofereceram suas vidas em prol desse experimento. O contato com eles é sempre muito mais didático, multidisciplinar e proveitoso do que o conteúdo que exista em qualquer livro.

**“Coragem, às vezes, é desapego. É parar de se esticar, em vão, para trazer a linha de volta. É permitir que voe sem que nos leve junto. É aceitar que a esperança há muito se desprendeu do sonho. É aceitar doer inteiro até florir de novo. É abençoar o amor, aquele lá, que a gente não alcança mais.”**

*Ana Jácómo*

Agradeço também a minha família. Grande parte do que eu sei e sou, devo a vocês. Obrigada pelo apoio e exemplo.

**“Pois de amor andamos todos precisados, em dose tal que nos alegre, nos reumanize, nos corrija, nos dê paciência e esperança, força, capacidade de entender, perdoar, ir para a frente. Amor que seja navio, casa, coisa cintilante, que nos vacine contra o feio, o errado, o triste, o mau, o absurdo e o mais que estamos vivendo ou presenciando.”**

*Carlos Drummond de Andrade*

Gostaria de agradecer meus amigos de longa data – Ariela Karani Batista, Denis Roberto Baptistella, Mario Konh Pelicer, Mirela Elisa da Silva e Fernandinha Diniz. Mesmo distante, o nosso pensamento estará sempre conectado. Para tudo mais que eu precisar, eu sei que tenho meu porto seguro.

**“A amizade é uma predisposição recíproca que torna dois seres igualmente ciosos da felicidade um do outro”.**

*Platão*

Gostaria de agradecer também aos meus amigos e colegas de turma de faculdade. Obrigada pelo companherismo e pelas boas risadas. Jaboticabal não é a mesma sem todos vocês.

**"Amar cria raiz, sim. Cria, independentemente de ser verbalizado. Basta sentir o amor para que fiquemos dependentes dele, uma dependência boa, daquilo que nos faz sentir vivos."**

*Martha Medeiros*

Obrigada Marcos Eli Buzanskas por tornar meus dias mais alegres, pelo companherismo e também seu auxílio neste trabalho.

Para todos vocês, eu desejo...

"Para você, desejo o sonho realizado,  
O amor esperado,  
A esperança renovada.  
Para você, desejo todas as cores desta vida,  
Todas as alegrias que puder sorrir,  
Todas as músicas que puder emocionar.  
Desejo que os amigos sejam mais cúmplices,  
que sua família esteja mais unida,  
que sua vida seja mais bem vivida.  
Gostaria de lhe desejar tantas coisas. Mas nada seria suficiente...  
Então, desejo apenas que você tenha muitos desejos. Desejos grandes e que eles possam te mover a cada minuto, ao rumo da sua felicidade."

*Carlos Drummond de Andrade*

## **APOIO FINANCEIRO**

Esse projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, processo nº. 2010/14785-1, no período de março de 2011 a fevereiro de 2013.

O presente trabalho foi avaliado pela COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL (CEBEA) desta unidade de ensino, que certificou sua conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

## SUMÁRIO

	Página
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	ii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	iv
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	v
<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	viii
<b>I. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	1
<b>II. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	2
A espécie <i>Mazama gouazoubira</i> .....	2
Produção <i>in vitro</i> de embriões .....	4
Estimulação ovariana.....	5
Métodos de colheita de oócitos.....	8
Maturação <i>in vitro</i> .....	10
Maturação nuclear.....	12
Maturação citoplasmática.....	13
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	15
<b>IV. HIPÓTESE</b> .....	16
<b>V. MATERIAL E MÉTODO</b> .....	17
Fêmeas doadoras de oócitos.....	17
Período de habituação.....	17
Estimulação ovariana.....	18
Recuperação de oócitos por videolaparoscopia.....	19
Ultrassonografia ovariana.....	21
Quantidade de folículos e taxa de recuperação de oócitos.....	22
Seleção e avaliação de CCO.....	23
Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	23
Avaliação da maturação nuclear e distribuição mitocondrial.....	24
Avaliação de oócitos não maturados <i>in vitro</i> .....	25
Análise estatística.....	25
<b>VI. RESULTADOS</b> .....	26
<b>VII. DISCUSSÃO</b> .....	34

<b>VIII. CONCLUSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>IX. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>43</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AI</b> .....	Anáfase I
<b>BE</b> .....	Benzoato de estradiol
<b>CIDR</b> .....	“Controlled internal drug release”
<b>CCO</b> .....	Complexo <i>cumulus</i> oócito
<b>DP</b> .....	Desvio padrão
<b>eCG</b> .....	Gonadotrofina coriônica equina
<b>EGF</b> .....	Fator de crescimento epidermal
<b>GVBD</b> .....	Rompimento da vesícula germinativa
<b>FIV</b> .....	Fertilização <i>in vitro</i>
<b>FSH</b> .....	Hormônio folículo estimulante
<b>LH</b> .....	Hormônio luteinizante
<b>LOPU</b> .....	“Laparoscopic ovum pick up”
<b>IA</b> .....	Inseminação artificial
<b>MI</b> .....	Metáfase I
<b>MII</b> .....	Metáfase II
<b>MIV</b> .....	Maturação <i>in vitro</i>
<b>MOET</b> .....	Múltipla ovulação e transferência de embriões
<b>PBS</b> .....	“Phosphate buffered saline”
<b>PIVE</b> .....	Produção <i>in vitro</i> de embriões
<b>TCM-199</b> .....	“Tissue culture medium”
<b>TI</b> .....	Telófase I
<b>VG</b> .....	Vesícula germinativa

## LISTA DE TABELAS

<p><b>Tabela 1.</b> Dados dos folículos visualizados com o uso da ultrassonografia ovariana realizadas com fêmeas superestimuladas de <i>M. gouazoubira</i>.....</p>	<b>26</b>
<p><b>Tabela 2.</b> Média <math>\pm</math> DP dos folículos visualizados, dos folículos aspirados e de oócitos colhidos em 13 colheitas por videolaparoscopia em fêmeas superestimuladas de <i>M. gouazoubira</i>.....</p>	<b>27</b>
<p><b>Tabela 3.</b> Número de folículos visualizados por ultrassom e por laparoscopia, e a presença ou ausência de aderências em oito procedimentos de aspiração folicular realizados nas fêmeas superestimuladas da espécie <i>Mazama gouazoubira</i> .....</p>	<b>29</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Manejo para habituação das fêmeas de *M. gouazoubira* para realizar as aplicações intramusculares de FSH. A fêmea foi retirada da baia (A) e encaminhada pelo corredor (B) até a caixa de contenção (C). Alimento atrativo foi oferecido pela janela próxima a cabeça do animal (D), enquanto a região posterior foi manipulada pela outra janela (E)..... **18**
- Figura 2.** Esquema do protocolo hormonal utilizado para estimulação ovariana das fêmeas de *M. gouazoubira*..... **19**
- Figura 3.** Válvula da bainha sendo acoplada ao insuflador de CO<sub>2</sub> (A) e o pneumoperitônio sendo estabelecido (B). Posicionamento das bainhas no abdômen do animal (C) e inserção da óptica laparoscópica (seta branca) e das pinças ginecológicas (setas laranjas) dentro das bainhas (D)..... **20**
- Figura 4.** Preensão do ovário pela pinça ginecológica (A) seguida por punção do folículo utilizando uma haste de metal acoplada a uma agulha de 22G (B). Bomba de aspiração folicular, conectada ao sistema e a agulha de aspiração folicular (C)..... **21**
- Figura 5.** Ultrassonografia ovariana transretal em fêmea de *M. gouazoubira*..... **22**
- Figura 6.** Representação gráfica do número de as estruturas (**Fol US** = número de folículos visualizados por ultrassom; **Fol Lap** = número de folículos visualizados por videolaparoscopia; **Fol Asp** = número de folículos aspirados; **Oo Col** = número de oócitos colhidos. \* = dados não registrados; **0** = nenhum oócito colhido) de cada uma das fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira*, em cada uma das colheitas a que foram submetidas..... **28**

**Figura 7.** Representação gráfica da classificação morfológica dos oócitos colhidos (n=94) das fêmeas superestimuladas da espécie *Mazama gouazoubira*. Valores estão expressos em porcentagem (%)..... **30**

**Figura 8.** Representação gráfica do número total de oócitos colhidos de cada uma das fêmeas superestimuladas da espécie *Mazama gouazoubira* segundo as categorias de classificação morfológica..... **30**

**Figura 9.** Representação gráfica das taxas de maturação nuclear (A) e citoplasmática (distribuição mitocondrial) (B) de 62 oócitos da espécie *M. gouazoubira*, submetidos a MIV..... **31**

**Figura 10.** Oócitos de *M. gouazoubira* corados com Hoescht 333452 (azul) e Mitotracker red CMXRos (vermelho). (A) Oócito com núcleo imaturo (GVBD); (B) Oócito com núcleo maturo (metáfase na seta superior e corpúsculo polar na seta inferior); (C) Oócito com distribuição mitocondrial heterogênea; (D) Oócito com distribuição mitocondrial homogênea; (E1, E2, F1 e F2) Oócitos que sofreram ativação espontânea por partenogênese. Na figura E1 é possível visualizar o núcleo de ambos os blastômeros (setas)..... **32**

**Figura 11 –** Representação gráfica das taxas dos estádios nucleares (A) e da distribuição mitocondrial (B) de 21 oócitos da espécie *M. gouazoubira*, logo após a colheita. **Indefinido \*** = Oócitos que não possibilitaram a definição do estágio nuclear.....

**33**

## ESTIMULAÇÃO OVARIANA, RECUPERAÇÃO E MATURAÇÃO DE OÓCITOS DE VEADO-CATINGUEIRO (*Mazama gouazoubira*)

**RESUMO** – Assim como outras espécies brasileiras de vida livre, os cervídeos têm sofrido pressões sobre seu habitat, o que provoca segregação entre populações, diminuição de troca gênica e de diversidade genética, aumento da endogamia, e um maior risco de extinção. A produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem ganhado destaque como uma ferramenta a ser utilizada nos programas de conservação de espécies selvagens *in situ* e *ex situ*. Entre as etapas da PIVE, a maturação *in vitro* (MIV) assume grande importância, pois o seu sucesso pode garantir a melhora nas taxas de produção de embriões. Assim, os objetivos do presente trabalho foram: avaliar viabilidade do protocolo de estimulação ovariana para a aspiração folicular, a eficiência da laparoscopia para a aspiração folicular, e a maturação nuclear e a distribuição mitocondrial em oócitos maturados *in vitro* para a espécie *M. gouazoubira*. Para isso, foram utilizadas cinco fêmeas, submetidas a repetidas estimulações ovarianas com intervalos de 30 dias. Os oócitos aspirados foram classificados morfolologicamente de acordo com a qualidade, submetidos à maturação *in vitro* por 24 horas e, posteriormente, corados para a avaliação da distribuição mitocondrial (Mitotracker Red CMXRos); e do estágio de maturação nuclear (Hoescht 33342). Foram realizados 14 procedimentos cirúrgicos para a colheita de 94 oócitos de fêmeas superestimuladas. A média de folículos visualizados, folículos aspirados e oócitos colhidos por cirurgia foi, respectivamente, de  $17,07 \pm 9,12$ ,  $13,54 \pm 6,64$  e  $7,15 \pm 3,72$ . Dos oócitos maturados *in vitro*, 64,52% alcançaram a MII e a classificação da distribuição mitocondrial não foi conclusiva. Houve ativação espontânea por partenogênese em 16,13% dos oócitos. Ainda, foi realizada avaliação de 21 oócitos não maturados, e destes, 81% se encontravam em vesícula germinativa ou quebra da vesícula germinativa segundo a classificação nuclear. Portanto, nas condições do presente estudo foi possível obter uma boa resposta de crescimento folicular, realizar a recuperação de oócitos por laparoscopia e maturar estes oócitos *in vitro*.

**Palavras-chave:** Cervídeos, oócitos, maturação *in vitro*, *Mazama gouazoubira*, PIVE.

## OVARIAN STIMULATION, RECOVERY AND OOCYTE MATURATION OF BROWN BROCKET DEER (*Mazama gouazoubira*)

**ABSTRACT** - The cervids, as well as other free-living brazilian species, have suffered pressures on their habitat, causing segregation between populations and reduced genetic exchange, which may decrease the genetic diversity and generate increased inbreeding and extinction risk. *In vitro* embryo production (IVEP) has been highlighted as a tool to be used in wild species conservation programs in *in situ* and *ex situ*. The maturation process has a great importance among the steps of IVEP, and its success can ensure an improvement in the rate of production of embryos. The objectives of this study were to assess feasibility of the protocol of ovarian stimulation for ovum pick, the efficiency of laparoscopy for oocyte retrieval, and the nuclear maturation and mitochondrial distribution in oocytes matured *in vitro* for the species *M. gouazoubira*. Thus, we used five females, submitted to repeated stimulation with intervals of 30 days. After the visualization of the ovaries, the visible follicles were counted and punctured by laparoscopy on day eight (D8). The aspirated oocytes were classified morphologically according the quality, subjected to *in vitro* maturation for 24 hours and then stained for the evaluation of mitochondrial distribution (Mitotracker Red CMXRos) and nuclear maturation stage (Hoescht 33342). Fourteen surgical procedures were performed on overstimulated females and 94 oocytes were collected in total. The average number of visualized follicles, aspirated follicles, and harvested oocytes was equal to  $17.07 \pm 9.12$ ,  $13.54 \pm 6.64$  e  $7.15 \pm 3.72$ , respectively. Of the *in vitro* matured oocytes, 64.52% reached the MII stage and 67.74% were classified with homogeneous mitochondrial distribution. There was spontaneous activation by parthenogenesis in 16.13% of the oocyte. Furthermore, 21 non-matured oocytes were evaluated and of these, 81% were in the germinal vesicle or germinal vesicle break down according the nuclear classification. Therefore, under the conditions of this study was possible to obtain good follicular growth response, oocyte retrieval by laparoscopy and *in vitro* maturation of the oocytes.

**Keywords:** Deer, oocytes, *in vitro* maturation, *Mazama gouazoubira*, IVEP.

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A região neotropical passa por um período crítico em termos de perda de biodiversidade e, assim como outras espécies brasileiras de vida livre, os cervídeos têm sofrido pressões sobre seu habitat, o que provoca segregação entre populações, diminuição de troca gênica e de diversidade genética, aumento da endogamia e maior risco de extinção (DUARTE, 2005).

Devido às dificuldades para a conservação dos habitats naturais, as técnicas de reprodução assistida (i.e. inseminação artificial (IA); fertilização *in vitro* (FIV); múltipla ovulação e transferência de embriões (MOET), transferência intra-falopiana de gametas, transferência nuclear, injeção intracitoplasmática de espermatozóides e clonagem) associadas aos bancos de reserva genômica (i.e. sêmen, oócitos, embriões, fibroblastos, etc) têm se mostrado ferramentas importantes para os programas de conservação *in situ* e *ex situ* (HOLT; PICKARD, 1999). Dessa forma, a colheita de material deve ser realizada em espécies ameaçadas e também naquelas que ainda não estejam em risco de extinção, na tentativa de manter a diversidade genética, que geralmente é perdida nas espécies raras (DUARTE; GARCIA, 1995).

As técnicas de reprodução assistida podem ser utilizadas para reduzir a perda de diversidade genética em pequenas populações, possibilitando a contribuição igualitária de todos os indivíduos para a próxima geração, e para estender o intervalo entre gerações, pela criopreservação de gametas e embriões (JABBOUR et al., 1997). Nesse contexto, a tecnologia de PIVE tem vantagens consideráveis em relação a IA e a MOET, uma vez que permite a total flexibilidade no pareamento de macho e fêmea, na potencial criopreservação de espermatozóides, oócitos e embriões, e na possibilidade de realizar a avaliação genética dos embriões (BAINBRIDGE et al., 1999).

Em 1989, a PIVE já era considerada uma ferramenta com grande potencial para resolver problemas reprodutivos encontrados em cativeiro como estresse, problemas fisiológicos ou peculiaridades comportamentais que impediam o fluxo de material genético entre os animais (WILDT, 1989). A partir da especulação dos resultados obtidos para bovinos, que confirmam a possibilidade de manter os oócitos em fluido folicular (folículos com 2 a 8mm de diâmetro) por um período de

até 6 horas a 30°C, ou ainda em TCM-HEPES por até 24h a 39°C na ausência de atmosfera gasosa (LEHMKUHL et al., 2002; ALVES et al., 2003), a aspiração folicular também pode ser uma técnica promissora para a obtenção de material de fêmeas de vida livre ou de jardins zoológicos. Como nestes locais o acesso a laboratórios, em geral, é restrito, é possível transportar os oócitos por certo período de tempo, de forma a não perderem a qualidade, até uma base com estrutura adequada para a manipulação destes gametas.

No entanto, o êxito da PIVE tem sido limitado aos cervídeos de criação comercial (SIRIARONRAT, 2006). Considerando que um terço das espécies de cervídeos do mundo é classificada como rara ou ameaçada de extinção e que as biotecnologias não estão estabelecidas para a maioria delas, a utilização de espécies próximas como modelo biológico seria uma alternativa interessante (BAINBRIDGE; JABBOUR, 1998). Devido a escassez de estudos sobre a PIVE em cervídeos neotropicais, novas pesquisas seriam importantes para a obtenção de avanços nas técnicas de reprodução assistida e, conseqüentemente, no auxílio aos programas de conservação *in situ* e *ex situ*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A espécie *Mazama gouazoubira*

No Brasil, são encontradas oito espécies da família Cervidae (*Blastocerus dichotomus*, *Mazama americana*, *M. bororo*, *M. gouazoubira*, *M. nana*, *M. nemorivaga*, *Odocoileus virginianus* e *Ozotoceros bezoarticus*). Destas espécies, *B. dichotomus* e *M. bororo* são classificadas como espécies “vulneráveis”, *O. bezoarticus* como “quase ameaçada”, *M. nana* e *M. americana* como “dados insuficientes” e as demais espécies (*M. gouazoubira*, *M. nemorivaga* e *Odocoileus virginianus*) encontram-se classificadas como situação “pouco preocupante” (IUCN, 2012). Apesar dessa classificação, *M. gouazoubira* é considerado regionalmente como “dados insuficientes” no Paraná, “vulnerável” no Rio Grande do Sul e “em perigo” no Rio de Janeiro (BERGALLO et al., 2000; FONTANA et al., 2003; MIKICH; BÉRNILS, 2004).

Esta espécie é encontrada ocupando o cerrado ao Sul do rio Amazonas até o Norte da Argentina (ÁVILA-PIRES, 1959; JUNGIUS, 1976; DUARTE, 1996). A coloração dos indivíduos é muito variável, podendo ir do cinza escuro até o marrom avermelhado. São animais de pequeno porte, com peso entre 13 Kg e 20,5 Kg e altura média de 0,50 m. Ocupam desde florestas densas contínuas até savanas abertas com poucas e pequenas manchas de mata. Possuem grande plasticidade, adaptando-se facilmente a terras cultivadas, necessitando apenas que estejam disponíveis pequenas áreas florestadas para seu abrigo (PINDER; LEEUWENBERG, 1997).

Os cervídeos de áreas tropicais e subtropicais não estão expostos a fortes mudanças ao longo do ano relacionadas ao fotoperíodo ou a flutuações de temperatura, e o único fator que pode afetar a sua reprodução é a disponibilidade de alimento (BUBENIK et al., 1991; MONFORT et al., 1993). No caso do gênero *Mazama*, por não existir um período criticamente pobre em recursos alimentares nos seus habitats naturais, a reprodução ocorre durante todo ano (PINDER; LEEUWENBERG, 1997).

Para *M. gouazoubira*, o período de gestação é de 208 a 215 dias, com ocorrência de estro pós-parto, refletindo a falta de estacionalidade reprodutiva (POLEGATO; DUARTE, 2003; PEREIRA et al., 2006). Assim como a maior parte das espécies de cervídeos, é uma espécie unípara (PINDER; LEEUWENBERG, 1997), com raros casos descritos sobre a ocorrência de gêmeos (SADLEIR, 1987; WHITEHEAD, 1993). Putman (1988) afirma que em geral os indivíduos atingem maturidade sexual com aproximadamente 18 meses. Quanto a duração do ciclo estral, Pereira et al. (2006) encontraram períodos variando de 21 a 37 dias, enquanto Muller e Duarte (1992) encontraram animais apresentando ciclos estrais de, aproximadamente, 21 dias. Pereira et al. (2006) descrevem a duração média da fase luteínica como  $24,6 \pm 1,4$  dias, e a fase folicular de  $1,7 \pm 0,1$  dias.

O estabelecimento das biotecnologias da reprodução para esta e outras espécies de cervídeos neotropicais apresenta limitações. A falta de conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva de cada espécie (COMIZZOLI et al., 2000), o comportamento agitado e a suscetibilidade ao estresse da maioria das espécies (DUARTE, 2010), são fatores que dificultam as pesquisas com cervídeos. Por ser o

cervídeo mais abundante dentre as espécies da família *Cervidae* no Brasil (DUARTE, 1996) e com alguns parâmetros reprodutivos já conhecidos, o veado-catingueiro (*M. gouazoubira*) foi escolhido como um modelo experimental. Os estudos desenvolvidos com essa espécie podem ser utilizados em outras espécies ameaçadas de extinção e facilitar o estabelecimento de um plano de manejo antes que haja diminuição populacional e perda da diversidade genética, como nas espécies raras e/ou ameaçadas (DUARTE; GARCIA, 1997).

Outros estudos utilizaram espécies não ameaçadas de cervídeos para estabelecer as biotecnologias reprodutivas de espécies em risco. Comizzoli et al. (2001) afirmam que *Cervus elaphus* e *Cervus nippon* são bons modelos para aplicação da PIVE em algumas subespécies correlatas que se encontram ameaçadas (*C. elaphus bactrianus*, *C. nippon pseudaxis*, *C. nippon taiouanus*). *Odocoileus virginianus* também é considerada uma espécie com potencial para desenvolver estratégias para propagação de espécies, subespécies e populações de vida livre (ASHER et al., 1999; e SIRIAROONRAT et al., 2010) e, estudos desenvolvidos com ela obtiveram resultados que puderam ser aplicados com sucesso para a PIVE de *Cervus eldi* (SIRIAROONRAT, 2006).

## **2.2. Produção *in vitro* de embriões**

A PIVE permite aprofundar os conhecimentos relativos aos processos fisiológicos, bioquímicos e biotecnológicos da espécie de interesse do estudo. Adicionalmente, esta técnica respalda o desenvolvimento de biotécnicas como clonagem por transferência nuclear, transgênese, sexagem de espermatozóides e embriões, criopreservação de oócitos e embriões, além da aplicabilidade em situações especiais de infertilidade animal (GONÇALVES et al., 2002).

Loskutoff et al. (1995) listam algumas vantagens da PIVE para os programas de conservação como: alternativa para IA em algumas espécies onde não se sabe o momento da ovulação e o local ideal de deposição do sêmen; possibilita obter um maior número de embriões em relação a coleta *in vivo* de fêmeas doadoras de embriões; possibilita utilizar animais que apresentem certos problemas de infertilidade; necessidade de menor número de espermatozóides viáveis para a fertilização, em comparação a IA ou cópula natural; possibilita o uso de técnicas

como a injeção intracitoplasmática de espermatozóide que permite o uso de sêmen com baixo índice de motilidade e vigor ou o uso de espermatozóides colhidos diretamente do epidídimo de animais mortos; possibilita utilizar material genético de fêmeas após sua morte e utilizar fêmeas pré-puberes ou prenhes como doadoras de oócitos.

A PIVE é a técnica mais eficiente para a propagação de pequenas populações, entretanto, é considerada uma técnica dispendiosa por englobar diferentes etapas: obtenção dos oócitos e MIV, capacitação *in vitro* dos espermatozóides, fertilização *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* dos embriões (COMIZZOLI et al. 2000). As baixas taxas de sucesso da PIVE estão associadas com algumas dessas etapas, como a habilidade em se obter oócitos de boa qualidade, a falta de conhecimento das condições ótimas para a maturação, fertilização, desenvolvimento *in vitro* e desenvolvimento de tecnologias para transferência dos embriões (SIRIAROONRAT, 2006).

Além disso, a viabilidade dos embriões produzidos por PIVE têm se mostrado inferior quando comparada àqueles produzidos *in vivo* (LOSKUTOFF et al., 1995). Em *C. elaphus*, a maioria dos embriões apresentava bloqueio em estágio de 8-16 células e menos de 10% desenvolveram-se até blastocisto, dificultando a implantação e levando a baixas taxas de concepção. Porém, estudos realizados por Berg e Asher (2003) sobre a composição do fluido de oviduto de *C. elaphus*, tornaram possível o desenvolvimento do Fluido de Oviduto Sintético de Cervídeo e a obtenção de melhores resultados no desenvolvimento *in vitro* dos embriões até o estágio de blastocisto (16,5% - BERG, ASHER, 2003).

### **2.3. Estimulação ovariana**

Para a realização da PIVE, primeiramente é necessária a obtenção de gametas femininos viáveis. Um dos fatores que determinará o sucesso da colheita de oócitos é a eficiência dos protocolos de estimulação ovariana, cujo objetivo é aumentar o número e o tamanho dos folículos produzidos, buscando explorar ao máximo o potencial reprodutivo das fêmeas e evitar a manipulação excessiva dos animais (PTAK et al., 2002). Além disso, CCOs obtidos de ovelhas previamente tratadas hormonalmente apresentam melhor capacidade de maturação, fertilização

e desenvolvimento *in vitro*, em relação a animais não tratados (O'BRIEN et al., 1997).

Visando o sucesso da estimulação ovariana, a melhor resposta às gonadotrofinas ocorre quando o tratamento é iniciado após a eliminação do folículo dominante (RUBIANES et al., 1995; RUBIANES et al., 1997), ou seja, quando o protocolo é iniciado no momento da emergência da primeira onda folicular, onde há um grande número de pequenos folículos (NASSER et al., 1993).

Na tentativa de eliminar o folículo dominante, o método mais efetivo e comum é a sincronização do início da onda folicular, através da inserção de um dispositivo intra vaginal de progesterona seguido pela aplicação de estradiol 17 $\beta$ -ou benzoato de estradiol (BE). Com essa associação, é possível originar uma nova onda folicular em cerca de 4 a 5 dias após o tratamento hormonal (BÓ et al., 1995). Isso porque os hormônios ovarianos esteroides estrogênio e progesterona conseguem suprimir progressivamente a secreção de gonadotrofinas. O estradiol reduz a amplitude do pulso de LH, atuando através de um efeito sobre a hipófise e hipotálamo, e a progesterona diminui a frequência dos pulsos de LH e acredita-se que seu efeito modulador se encontra no hipotálamo (DAVIDSON; STABENFELDT, 1999; PRINCE; WEBB, 1988). Já quando as concentrações circulantes de progesterona são baixas, o tratamento com estradiol está associado com o surgimento da onda de LH (BÓ et al., 1995).

A utilização do implante intravaginal de progesterona por um período curto (5 a 8 dias) foi inserida com sucesso nos protocolos hormonais de ruminantes e possibilitou que os protocolos de estimulação ovariana induzissem o surgimento de nova onda folicular (RUBIANES et al., 2003). Seu uso por 8 dias já foi testado em *M. gouazoubira* (CURSINO et al., 2009; ZANETTI, 2009) e em *M. americana* (SALVIANO, 2009). A utilização do implante por um curto tempo possibilitou melhores taxas de fertilidade, uma vez que os oócitos provém de folículos jovens (SAVIO et al., 1993), enquanto que os protocolos onde os dispositivos são utilizados por um tempo maior (11 a 14 dias), tem a desvantagem de originar folículos persistente (envelhecidos) (VIÑOLES et al., 2001; EVANS et al., 2001) que estão associados a menores taxas de fertilidade (SAVIO et al., 1993).

Para garantir o crescimento folicular, a gonadotrofina coriônica equina (eCG) foi a primeira gonadotrofina amplamente usada nos protocolos de superovulação (COGNIE, 1999). Ele possui um tempo de ação prolongado, sendo que, dependendo da dose, uma única aplicação intramuscular é suficiente para promover a superestimulação ovariana. Porém, este tempo de ação prolongado pode provocar um crescimento folicular disperso (BAINBRIDGE et al., 1995; BAINBRIDGE et al., 1996). Seu uso em algumas espécies de cervídeos como *Dama dama* resultou em prejuízos no recrutamento, maturação folicular e fertilidade (ASHER et al., 1995). Além disso, foi observado que seu uso recorrente reduziu progressivamente a resposta ovulatória em ovinos, caprinos e bovinos (PIGON et al., 1960; JAINUDEEN et al., 1966; BARIL et al., 1992), e provocou uma marcada resposta imune humoral em caprinos, com redução da atividade ovariana (ROY et al., 1999).

O hormônio folículo estimulante (FSH), uma glicoproteína de origem hipofisária, é outra gonadotrofina de uso comum em ruminantes domésticos para induzir o crescimento folicular inicial (GOODHAND et al., 2000). Devido a sua meia-vida curta, é recomendada a aplicação de 12 em 12 horas em doses decrescentes ou constantes. Em um estudo sobre a sincronização de ovelhas, o tratamento estimulatório com doses constantes de FSH resultou em oócitos melhores e embriões mais tolerantes à criopreservação, quando comparados ao tratamento com doses decrescentes (BERLINGUER et al., 2004).

Os protocolos de superovulação ou estimulação ovariana já foram testados com sucesso em algumas espécies de cervídeos como *O. virginianus* (WALDHALM et al., 1989), *C. elaphus* (ASHER et al., 1992), *Rangifer tarandus* (KROGENAES et al., 1994), *D. dama* (MORROW et al., 1994), *C. eldi* (SIRIAROONRAT, 2006), *M. gouazoubira* (ZANETTI, 2009; ZANETTI; DUARTE, 2012) e *M. americana* (SALVIANO et al., 2009). Alguns autores contraindicam o uso de FSH isoladamente em cervídeos, devido ao estresse desencadeado pelas múltiplas aplicações do hormônio (WENKOFF; BRINGANS, 1991), e pelo grande número de animais que não respondem ao tratamento (FENESEY et al., 1989; BERG et al., 1995). No entanto, em *C. nippon nippon*, o FSH possibilitou a colheita de oócitos de boa qualidade pela videolaparoscopia, independentemente da época

do ano (LOCATELLI et al., 2006). Zanetti (2009) mostrou ser possível a realização de múltiplas aplicações de FSH em *M. gouazoubira*, realizando um período prévio de habituação.

Testando diferentes protocolos de superovulação, Zanetti (2009) verificou que as melhores respostas de crescimento folicular foram obtidas nos tratamentos onde foram utilizados 700 UI de eCG e 130 mg de FSH ( $13,2 \pm 2,6$  e  $10,4 \pm 1,1$  de estímulo folicular total respectivamente), no entanto, o protocolo que utilizou eCG causou diminuição na resposta ovariana quando os animais foram submetidos a repetições do tratamento hormonal (ZANETTI, comunicação pessoal). O protocolo de múltiplas aplicações de FSH foi testado posteriormente por Salviano et al. (2009) para a colheita de oócitos em *M. americana*, resultando em boa resposta de crescimento folicular e recuperação por laparotomia de oócitos viáveis para MIV.

#### **2.4. Métodos de colheita dos oócitos**

Em pequenos ruminantes, não é possível manipular o trato reprodutivo por via retal e vaginal, como ocorre em bovinos e eqüinos (TERVIT, 1996). Por ser considerada uma técnica menos invasiva do que a laparotomia, a laparoscopia (“laparoscopic ovum pick-up” – LOPU) já foi utilizada em cervídeos de médio e pequeno porte (BAINBRIDGE et al., 1999; COMIZZOLI et al., 2001; SIRIAROONRAT, 2006), proporcionando recuperação rápida e possibilidade de repetição da técnica na mesma fêmea. Em cabras, a LOPU realizada com intervalos de uma semana (durante seis semanas consecutivas), mostrou-se uma técnica segura e eficiente, pois não provocou aderências significativas, otimizando a reprodução do animal (CORDEIRO, 2006).

Parte do sucesso da LOPU é mensurada pela taxa de recuperação dos oócitos, porém um dos principais problemas desta técnica está relacionado a perda de camadas celulares do cumulus (TIBARY et al., 2005). Sendo assim, é importante ter controle sobre as condições de aspiração e adaptá-las de acordo com as diferentes espécies, considerando, principalmente, o diâmetro da agulha de punção e a pressão utilizada (BOLS et al., 1996). Para bovinos, já foram testadas pressões entre 40 e 400 mmHg (revisado por BOLS et al., 1996), sendo que pressões mais baixas, como 50 mmHg, foram pouco eficientes para a aspiração

dos oócitos (menor taxa de recuperação) e pressões mais altas, como 120 mm Hg, causaram níveis elevados de desnudamento das células do cumulus (BOLS et al., 1996a; BOLS et al., 1996). Em ovinos, as bombas de vácuo são ajustadas com pressão entre 25 a 100 mmHg (BALDASSARRE et al., 1996; COGNIÉ et al., 2004; COX; ALFARO, 2007; MORTON et al., 2008). Entretanto, todo o sistema (comprimento e diâmetro de conexões, altura do equipamento de vácuo, diâmetro da agulha) pode influenciar na pressão de vácuo final, e para quantificá-lo de forma mais real, alguns autores sugerem mensurar o vácuo em volume de água por minuto (SENEDA; BLASCHI, 2004,). Para ovinos são utilizados fluxos de 6,5 a 20 mL água/min (ALVAREZ et al. 1999; RODRÍGUEZ et al., 2000; ALBERIO et al. 2001; ALBERIO et al., 2002; COGNIÉ et al., 2004)

Quanto ao diâmetro da agulha, normalmente se utilizam em ovinos calibres entre 18 a 21G (COGNIÉ et al., 2004; RODRIGUEZ et al., 2006; COX; ALFARO, 2007). Bols et al. (1996) constatou que agulhas mais finas resultam na obtenção de uma proporção menor de oócitos desnudos, porém, há uma menor taxa de colheita. O comprimento e diâmetro do bixel também são importantes, para evitar a perda de fluído folicular e, conseqüentemente, dos oócitos durante a colheita (RODRIGUEZ et al., 2006).

As taxas de produção embrionária também são influenciadas pela pressão e diâmetro da agulha utilizados. Tervit et al. (1995) obtiveram melhores taxas de desenvolvimento embrionário para CCOs aspirados a 15, 20 e 50 mmHg; Morton et al. (2008) relataram melhores resultados quando a aspiração foi realizada com pressão de 50 e 100 mmHg, enquanto Bols et al. (1996) encontraram maiores taxas de blastocistos com pressão de 70 e 90 mmHg, utilizando agulhas de 18G e 19G. A influência na produção embrionária se deve principalmente ao desnudamento dos CCOs, que reflete na capacidade dos oócitos em atingirem a maturação meiotica, a fertilização e o desenvolvimento (ZHANG et al., 1995). As células do cumulus também são necessárias, por no mínimo 12 horas, para que haja a maturação citoplasmática normal (CHIAN; NIWA, 1994) e, a sua presença no momento da fertilização é essencial, uma vez que a polispermia é significativamente maior em oócitos desnudos (BEHALOVA; GREVE, 1993).

## 2.5. Maturação *in vitro* (MIV)

Muitos fatores podem interferir no sucesso da PIVE, como o tamanho dos folículos puncionados (MACHATKOVA, 2004), o diâmetro da agulha e a pressão utilizada (BOLS et al., 1996), a fase folicular (crescimento ou dominância) em que os oócitos são colhidos (MACHATKOVA, 2004), o diâmetro dos oócitos (FAIR et al., 1995), a morfologia do CCO (LEIBFRIED E FIRST, 1979), o nível de atresia dos folículos (BLONDIN E SIRARD, 1995) e a maturação oocitária. Esta etapa merece uma atenção especial, pois como os oócitos são obtidos de folículos imaturos a MIV é necessária para a obtenção de uma população mais homogênea e, conseqüentemente, de melhores resultados da PIVE (HENDRIKSEN et al., 2000; MACHALKOVA et al., 2004). É durante esse processo que o oócito adquire competência, tornando-se capaz de completar a maturação, ser fertilizado e prosseguir o desenvolvimento embrionário inicial, até que haja a transição materno-zigótica (HYTTEL et al., 1997).

Segundo Sirard (2001) é possível dividir a maturação oocitária em maturação nuclear, com a modificação do status da cromatina em estágio de dictióteno até o de MII, e maturação citoplasmática, englobando todas as mudanças na distribuição e organização individual das organelas. Ainda, ocorrem eventos moleculares, que emitem sinais que controlam os aspectos anteriores. Os oócitos devem ser cultivados em meios propícios para que a maturação seja adequada e sincronizada entre todos esses aspectos. Estes meios podem variar conforme a espécie. Em ruminantes domésticos é utilizado como meio base o TCM -199 (“tissue culture medium -199”) com sais de Earle. Esse meio é modificado conforme a rotina de cada laboratório, podendo ser adicionado L-glutamina, bicarbonato de sódio, HEPES, piruvato de sódio e hormônios. Em relação aos hormônios, é usual a utilização do LH, FSH ou ainda a combinação dessas gonadotrofinas (GONÇALVES et al., 2002).

Os hormônios gonadotróficos (FSH e LH) são reguladores da MIV nuclear de oócitos de mamíferos e o estradiol parece estar envolvido tanto na maturação citoplasmática quanto na nuclear (TIBARY et al., 2005). O FSH é considerado essencial para maturação de oócitos de *C. elaphus* e *C. nippon*, uma vez que a sua utilização aumentou significativamente a porcentagem de oócitos maturados,

quando utilizado em substituição ao EGF (COMIZZOLI et al., 2001). O estradiol também foi incluído com sucesso nos sistemas de MIV para cervídeos (KROGENAES et al., 1994; BERG; ASHER, 2003; COMIZZOLI et al., 2001; SIRIAROONRAT et al., 2010), sendo que em *O. virginianus*, teve grande influência na melhora dos resultados de maturação nuclear. No entanto, isso foi válido apenas para oócitos grau I, sendo indiferente aos oócitos de grau II e III (SIRIAROONRAT et al., 2010).

O tempo necessário para alcançar a MIV varia entre as espécies, sendo de 23 a 26 h para ovelhas (BIRLER et al., 2002; BALDASSARE et al., 1996; AL-AGHBARI et al., 2002), 24 a 27 h para cabras (SAMAKE et al., 2000; AGRAWAL et al., 1995) e 24 a 26 h de cultura para camelos (SHORGAN et al., 1993). Entretanto, diferenças nas condições de cultivo bem como os componentes do meio podem afetar o tempo para atingir a maturação. A exemplo, foram reportados estudos em que o tempo de maturação foi prolongado a 32 h para ovinos (YADAV et al., 1997) e a 30 - 32 h de cultura em oócitos de caprinos (SHARMA et al., 1996; YADAV et al., 1997).

Em cervídeos a MIV já foi reportada em *C. nippon* (COMIZZOLI et al., 2001; LOCATELLI, 2006), *R. tarandus* (KROGENAES et al., 1994) *C. elaphus* (FUKUI et al., 1991; POLLARD et al., 1995; COMIZZOLI et al., 2001; BERG et al., 2002; BERG; ASHER, 2003) *O. virginianus* (SIRIAROONRAT et al., 2010) e *C. eldi thamin* (SIRIAROONRAT, 2006), sendo que 24 horas parece ser o tempo ideal para a maturação dos oócitos da maioria das espécies. Oócitos de *C. elaphus* que maturaram por 20 ou 24 h obtiveram melhores taxas de clivagem embrionária em comparação àqueles maturados por 16 e 28 h (FUKUI et al., 1991). No entanto, os estudos sobre maturação nas espécies de cervídeos tem se limitado a maturação nuclear (BERG; ASHER, 2003).

Os estudos realizados com cervídeos têm usado meios de maturação semelhantes àqueles utilizado para ruminantes domésticos, tendo como base o TCM-199, adição de gonadotrofinas (FSH e LH) e de uma fonte proteica como o soro fetal bovino (FUKUI et al., 1990; KROGENAES et al., 1994; POLLARD et al., 1995; COMIZZOLI et al., 2000; BERG ET AL., 2002; LOCATELLI, 2006; SIRIAROONRAT, 2009) ou BSA. Ainda, pode ser utilizado fluido folicular

(COMIZZOLI et al., 2000; LOCATELLI, 2006), estradiol (FUKUI et al., 1991; SIRIAROONRAT, 2009), cisteína (LOCATELLI et al., 2006), piruvato (KROGENAES et al., 1994, BERG ET AL., 2002; SIRIAROONRAT, 2009), entre outros.

## 2.6. Maturação nuclear

*In vivo*, a maturação nuclear é induzida pelo pico de hormônio luteinizante (LH) e os oócitos passam por várias modificações moleculares e estruturais antes de completar a maturação. *In vitro*, a retomada da meiose ocorre repentina e espontaneamente, independente da competência adquirida (ADONA; LEAL, 2006; GILCHRIST; THOMPSON, 2007). Os oócitos presentes nos folículos antrais são removidos do ambiente folicular e cultivados em meio adequado, reiniciando espontaneamente a divisão meiótica (MILOVANOV; SIRARD, 1994).

Diferenças entre as espécies têm sido relatadas quanto à cinética da maturação nuclear (GALL et al., 1993; CROSBY et al., 1984; KASTROP et al., 1990). O tempo necessário para a conclusão da primeira divisão meiótica *in vitro* de oócitos bovinos varia de 18 a 24 horas (HYTEL et al., 1989). Primeiramente ocorre o rompimento da vesícula germinativa (GVBD) que, *in vitro*, acontece entre sete e 12 horas após o início do cultivo. Posteriormente, ocorre a progressão até metáfase I (MI) entre 12 e 15 horas. A anáfase I (AI) e a telófase I (TI) ocorrem entre 15 e 18 horas e a metáfase II (MII), a partir de 18 horas (HYTEL et al., 1989; VIGNOLA et al., 1994).

A MIV por 24 horas parece ser o ideal para a maioria das espécies de cervídeos, pois uma alta proporção de oócitos (50 a 78%) maturados por esse período alcançou MII nas espécies *O. virginianus* (SIRIAROONRAT et al., 2010), *C. elaphus* (BERG et al., 2002; COMIZZOLI et al., 2001), *C. nippon* (COMIZZOLI et al., 2001), *R. tarandus* (KROGENAES et al., 1994). Para *C. elaphus* a cinética da maturação *in vivo* é semelhante à de outros ruminantes domésticos, com ocorrência da MI entre 12 a 18 horas após o pico de LH pré-ovulatório e MII entre 18 e 20 h (BERG et al., 2008). Em *O. virginianus* a cinética da progressão nuclear dos oócitos foi observada *in vitro*, sendo que oócitos em estágio de vesícula germinativa (VG) foram observados de 0 a 3 h, as primeiras ocorrências de oócitos

no estágio de TI ou MII foram observadas após 12 h de cultura, e essas fases nucleares predominaram (63%) com 24 horas de cultura (SIRIANROONRAT et al., 2010). Para *M. gouazoubira* foi realizado um trabalho sobre cinética da maturação com oócitos provenientes de dois indivíduos, e apesar do pequeno número de oócitos, os autores puderam verificar que são necessárias 20 a 25 horas de cultivo para que mais de 50% dos oócitos atinjam a MII (CURSINO et al., 2009).

## **2.7. Maturação citoplasmática**

Algumas vezes é observada a perda na sincronia entre maturação citoplasmática e nuclear e, alguns oócitos retomam a meiose sem ter adquirido plena capacitação (ADONA; LEAL, 2006; GILCHRIST; THOMPSON, 2007), ou seja, nem todos os oócitos que completam a maturação nuclear têm a capacidade de desenvolver-se até o estágio de blastocisto, e este fato pode ser atribuído ao grau insuficiente de maturação citoplasmática (SIRARD et al., 2006). A maturação inadequada do oócito, seja do núcleo ou do citoplasma, inviabiliza a fecundação e aumenta a ocorrência de polispermia, partenogênese e bloqueio do desenvolvimento embrionário (XU; BRACKET, 1988).

Na maturação citoplasmática ocorrem mudanças como o rearranjo de organelas (FAIR, 2003, SIRARD, 2006) e a síntese de proteínas e mRNA (WU et al., 1996), que são eventos cruciais para a fertilização e posterior desenvolvimento embrionário. O reposicionamento das organelas varia de acordo com as necessidades da célula durante cada fase do desenvolvimento, e essa movimentação durante a maturação ocorre devido aos microfilamentos e microtúbulos do citoesqueleto (KRISHER; BAVISTER et al., 1998; STOJKOVIC et al., 2001), sendo que a migração dos grânulos corticais (VELILLA et al., 2004) e das mitocôndrias têm sido correlacionados com a competência do oócito (HYTTEL et al., 1997).

Os grânulos corticais são derivados do complexo de Golgi (WESSEL et al., 2001), e em oócitos na fase VG, estão distribuídos em clusters ao longo de todo o citoplasma (HOSOE; SHIOYA, 1997). Ao final do período de maturação, quando os oócitos atingem a fase de MII, os grânulos se distribuem apenas na periferia,

próximo à membrana plasmática (THIBAUT; SZÖLLÖSI; GÉRARD, 1987), criando um mecanismo para a prevenção da poliespermia (HOSOE; SHIOYA, 1997).

Já as mitocôndrias agem na produção de ATP, componente responsável pelo fornecimento de energia que é consumida durante o processo de maturação (KRISHER; BAVISTER et al., 1998; STOJKOVIC et al., 2001) e, necessário para que haja a maturação, fertilização e o desenvolvimento embrionário (WILDING et al., 2001). Elas se concentram na periferia do oócito durante o estágio de VG, enquanto que em oócitos maduros (MII) estas estruturas migram em direção ao centro (STOJKOVIC et al., 2001; SUN et al., 2001). O movimento das mitocôndrias para as áreas de elevado consumo de energia é essencial para os oócitos e embriões durante períodos críticos do ciclo celular (KRISHER; BAVISTER et al., 1998; STOJKOVIC et al., 2001). A análise ultra-estrutural de oócitos bovinos submetidos a MIV mostrou que o movimento das mitocôndrias a partir de uma posição mais periférica para uma distribuição mais dispersa por todo o citoplasma ocorre após 12-18 horas de cultura (HYTTEL et al., 1986). Este evento é semelhante ao que ocorre in vivo, onde há uma distribuição mais periférica antes da onda pré ovulatória de LH, uma formação de cluster cortical nas fases intermediárias finais da maturação nuclear, e uma distribuição dispersa após a extrusão do corpúsculo polar, aproximadamente 19 h após o pico de LH (KRUIP et al., 1993; HYTTEL et al., 1997).

### 3. OBJETIVOS

Avaliar para a espécie *M. gouazoubira*:

- A viabilidade do protocolo de estimulação ovariana a base de progesterona e BE, associado ao FSH, para aspiração folicular;

- A eficiência do uso da laparoscopia para a aspiração folicular;

- A maturação nuclear e a distribuição mitocondrial em oócitos maturados *in vitro*.

#### 4. HIPÓTESES

- O protocolo hormonal a base de progesterona e BE, associado ao FSH promoverá uma eficiente resposta de estimulação ovariana, possibilitando a aspiração folicular na espécie *M. gouazoubira*;
- A laparoscopia possibilitará a recuperação de oócitos viáveis desta espécie;
- O meio de maturação avaliado possibilitará a MIV dos oócitos desta espécie.

## 5. MATERIAL E MÉTODO

### 5.1. Fêmeas doadoras de oócitos

Para este experimento foram utilizadas cinco fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira*, com idade entre 1 ano e três meses e oito anos, pesando entre 15,6 e 18,8 kg, e pertencentes ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP. O experimento foi realizado de 20/12/2011 a 22/02/2013. Os animais receberam dieta composta por alimentos concentrados utilizados para eqüinos (Omolene<sup>®</sup> - Purina<sup>®</sup>), fornecida diariamente pela manhã e alimento volumoso: soja perene (*Neonotomia wighti*), alfafa (*Medicago sativa*) ou ramos de amoreira (*Morus alba*), que foram fornecidos de acordo com a sua disponibilidade no campo, numa quantidade média de 1Kg/animal/dia, no final da tarde (sempre molhado, com intuito de adiar o murchamento e mantê-los aceitáveis pelos animais por mais tempo). A água foi oferecida *ad libitum*.

### 5.2. Período de habituação

As fêmeas foram submetidas a um período de habituação para possibilitar as aplicações intramusculares de FSH. Para isso, durante um mês, elas foram retiradas diariamente das baias e conduzidas até uma caixa de contenção (Figura 1A e 1B), onde permaneciam por cinco minutos (Figura 1C). Durante este tempo, cada animal foi manipulado por duas janelas superiores. Pela janela próxima a cabeça do animal, foi oferecido fruta como um atrativo e reforço positivo (Figura 1D). Simultaneamente, pela outra janela, a região posterior da fêmea foi manipulada (Figura 1E) a fim de habituá-la ao futuro manejo (ZANETTI, 2009).

Na primeira semana estes procedimentos foram realizados duas vezes ao dia, sendo uma vez pela manhã e uma vez pela tarde. Nas demais semanas os animais foram submetidos ao procedimento apenas uma vez ao dia, no período da manhã.

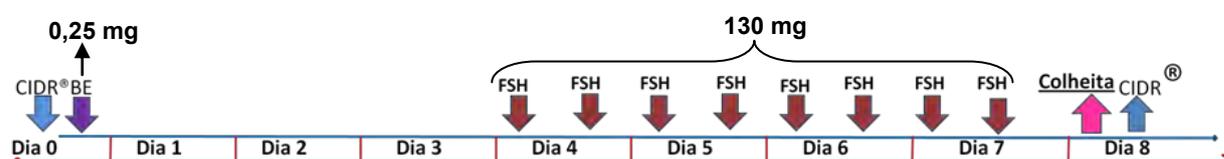


**Figura 1** – Manejo para habituação das fêmeas de *M. gouazoubira* para realizar as aplicações intramusculares de FSH. A fêmea foi retirada da baia (A) e encaminhada pelo corredor (B) até a caixa de contenção (C). Alimento atrativo foi oferecido pela janela próxima a cabeça do animal (D), enquanto a região posterior foi manipulada pela outra janela (E).

### 5.3. Estimulação ovariana

Para otimizar a recuperação de oócitos, o estro das fêmeas foi sincronizado, Após a contenção física dos animais, foi colocado um dispositivo intravaginal impregnado com 0,33g de progesterona, desenvolvido para ovinos e caprinos (CIDR<sup>®</sup> Tipo T - *Controlled Internal Drug Release*<sup>®</sup>, Pfizer<sup>®</sup> EUA), por 8 dias, e uma aplicação intramuscular de 0,25mg (0,25mL) de BE (Estrogin<sup>®</sup> - Farmavet Produtos Veterinários Ltda - Brasil) foi realizada no momento da inserção do implante (D0). No quarto dia (D4) de implantação do dispositivo de progesterona foi iniciada a administração das doses de FSH a cada 12 horas. Oito doses iguais foram aplicadas, totalizando a administração de 130mg de FSH (Folltropin<sup>®</sup>-V – Tecnopec<sup>®</sup> - Canadá). As aplicações foram realizadas dentro da caixa de contenção por via intramuscular (ZANETTI, 2009), como mostra o esquema a

seguir (Figura 2). As repetições dos tratamentos de estimulação ovariana foram realizadas com intervalos aproximados de 30 dias após a última aspiração.



**Figura 2** — Esquema do protocolo hormonal utilizado para estimulação ovariana das fêmeas de *M. gouazoubira*.

#### 5.4. Recuperação de oócitos por videolaparoscopia

Oito dias após o início do tratamento hormonal (D8) as fêmeas, que haviam sido submetidas a jejum sólido e hídrico de 24 horas, foram contidas fisicamente e anestesiadas com associação de 5,0 mg/Kg de cloridrato de quetamina (Vetaset® - Fort Dodge - Brasil), 0,3 mg/Kg de cloridrato de xilazina (Rompum® - Bayer - Brasil) e 0,5 mg/Kg de midazolam (Dormonid® - Roche - Brasil), por via intravenosa (veia jugular). Os animais foram intubados e mantidos em plano superficial com isoflurano durante o procedimento (Forane® - Abbott - Brasil), na concentração média de  $0,89 \pm 0,08$  V%, mensurada com vaporizador calibrado para esse fármaco (HB® Hospitalar – Brasil). Após a anestesia, foi preparado o campo cirúrgico com tricotomia da região abdominal, antissepsia cirúrgica e colocação dos panos de campo. A fêmea foi posicionada em uma inclinação de 45° de elevação dos membros posteriores (posição “Trendelenburg”) para melhor visualização dos órgãos reprodutores.

Para insuflar a cavidade abdominal, foi feita uma pequena incisão na pele com o bisturi, realizada 5 cm cranial à glândula mamária e 5 cm à esquerda da linha média, para facilitar a introdução de um trocáter de 5 mm de diâmetro com bainha tipo curta e rosqueável e válvula para CO<sub>2</sub>. Esta válvula foi acoplada ao insuflador de CO<sub>2</sub>, e o pneumoperitônio foi estabelecido com pressão intra-abdominal mantida a 8 mmHg e uma taxa de fluxo de 5 L/minuto (Figura 3A e B). Outros dois trocátters, um situado a 10 cm cranial ao úbere e na posição da linha média com uma bainha de 5 mm tipo janela, e o outro 5 cm cranial a glândula mamária e 5 cm a direita da linha média, de 5 mm de diâmetro e bainha tipo curta e

rosqueável foram introduzidos (Figura 3C). No trocáter posicionado na linha média foi introduzida a óptica laparoscópica (30cm/5mm/30°), conectada ao cabo de fibra ótica, à fonte de luz e à microcâmera. Nas outras duas bainhas laterais a linha média, foram introduzidas pinças ginecológicas atraumáticas, para manipulação e posicionamento dos ovários (Figura 3D).



**Figura 3** – Válvula da bainha sendo acoplada ao insuflador de CO<sub>2</sub> (A) e o pneumoperitônio sendo estabelecido (B). Posicionamento das bainhas no abdômen do animal (C) e inserção da óptica laparoscópica (seta branca) e das pinças ginecológicas (setas laranjas) dentro das bainhas (D).

O ovário foi imobilizado por prensão da pinça, próximo ao seu ligamento (Figura 4 A). Em seguida, uma das pinças foi retirada e uma haste de metal conectada a uma agulha de aspiração folicular para ovinos (22G) (WTA®, Cravinhos/SP, Brasil) foi introduzida na cavidade abdominal. A agulha foi acoplada a um circuito de aspiração junto a uma bomba de precisão de vácuo contínuo (ajustada a 100mmHg, fluxo de 11 mL de água/min) (Figura 4 C) e o fluido folicular foi recuperado em um tubo de colheita de 50mL. Antes de iniciar a aspiração, o

tubo e o circuito foram lavados com meio de colheita (“phosphate buffered saline” - PBS completo com 10UI/mL de heparina) aquecido a 38°C e aproximadamente 2mL desse meio foram depositados no fundo do tubo para receber os oócitos.

Após a aspiração dos folículos, os ovários foram lavados com o meio de colheita para diminuir possíveis aderências. Ao final da videolaparoscopia o CO<sub>2</sub> foi retirado da cavidade abdominal, por pressão manual, e as incisões cirúrgicas da musculatura e da pele foram suturadas com fio de nylon 2-0. Os animais receberam uma aplicação de antibiótico (Benzilpenicilina benzatina - 40.000U/Kg) e anti-inflamatório (meloxicam 0,2% - 0,025mL/kg) intramuscular logo após o término do procedimento cirúrgico e o CIDR<sup>®</sup> foi retirado.



**Figura 4** – Preensão do ovário pela pinça ginecológica (A) seguida por punção do folículo utilizando uma haste de metal acoplada a uma agulha de 22G (B). Bomba de aspiração folicular, conectada ao sistema e a agulha de aspiração folicular (C).

### 5.5. Ultrassonografia ovariana

Da sexta a décima terceira cirurgia videolaparoscópica, visando dar suporte a avaliação do protocolo de estimulação ovariana, foi incluída a avaliação ultrassonográfica do ovário, que permitiu a quantificação e mensuração dos folículos com diâmetro igual ou superior a 2 mm. Após anestesiá-los os animais, a ultrassonografia ovariana (Modo-B) por via transretal foi realizada, utilizando o aparelho MyLab VET 30 (Esaote, Genova, Itália) e o transdutor linear multifrequencial de 7 a 12MHz. As fêmeas foram mantidas em decúbito esternal e a manipulação externa do transdutor foi feita mediante a fixação de um tubo de plástico ligeiramente curvado (comprimento 30 cm). Após remoção das fezes do reto e deposição do gel sobre o transdutor, este foi introduzido no reto com a

superfície de contato posicionada perpendicularmente à parede abdominal (Figura 5). Quando a bexiga urinária foi ultrapassada e os cornos uterinos localizados, o transdutor foi lentamente rotacionado para esquerda e direita com finalidade de identificar os ovários e suas estruturas. Avaliou-se quantitativamente a presença de estruturas foliculares, assim como o diâmetro destas estruturas e dos ovários. Os folículos foram distribuídos em categorias, conforme seu diâmetro, calculado pela equação  $[D=(A+B)/2]$ ; sendo que A representa a altura máxima e B o diâmetro transversal máximo. De acordo com os padrões descritos para ovinos e caprinos, folículos da categoria 1 ( $\geq 4,5$  mm de diâmetro) em geral encontram-se em estágio final de crescimento, onde há possibilidade de apresentar oócitos que tenham iniciado o processo de maturação. Na categoria 2 (4,4 a 2,6 mm), encontramos as estruturas desejáveis para a aspiração folicular devido a maior facilidade para realização do procedimento e potencial qualidade dos oócitos obtidos, e na categoria 3 ( $\leq 2,5$  mm) as estruturas não são possíveis, ou são muito difíceis de serem aspiradas por videolaparoscopia. Após o exame ultrassonográfico, os animais foram submetidos ao procedimento de videolaparoscopia abdominal para aspiração folicular.



**Figura 5** – Ultrassonografia ovariana transretal em fêmea de *M. gouazoubira*.

### **5.6. Quantidade de folículos e taxa de recuperação de oócitos**

As cirurgias de videolaparoscopia foram gravadas e, posteriormente, assistidas para auxiliar nas contagens do número de folículos visualizados e aspirados. Para calcular a taxa de recuperação oocitária, foi determinado o número

de oócitos colhidos em relação ao número de folículos puncionados (%). Considerando o número limitado de animais disponíveis para o experimento foi proposta a colheita e avaliação morfológica de, no mínimo, 70 oócitos.

### **5.7. Seleção e avaliação do complexo cumulus oócito**

Os oócitos colhidos foram transferidos para uma placa de poliestireno e avaliados em estereomicroscópio no aumento de 40x. Uma vez localizados, os oócitos foram lavados duas vezes em 70  $\mu$ L de meio de lavagem (TCM-199 contendo 20mM de tampão HEPES e 5mM de bicarbonato de sódio) e avaliados quanto a morfologia do CCO e à distribuição da granulação segundo descrito por Viana et al. (2004), com adaptações: Grau I - CCO compacto, mais de três camadas de células do cumulus, citoplasma homogêneo; Grau II - CCO compacto com três ou menos camadas de células do cúmulus, ou oócito com citoplasma levemente heterogêneo; Grau III - Oócito parcialmente desnudo, mostrando remoção de células do cúmulus em menos de um terço da superfície da zona pelúcida, ou citoplasma heterogêneo; Grau IV - Desnudo, ausência de células do cúmulus na maior parte da superfície da zona pelúcida, pode haver ou não granulações no citoplasma; Degenerados - ooplasma irregular e/ou contraído, apresenta espaço entre a membrana citoplasmática e a zona pelúcida, vacuolizado ou fragmentado. Os oócitos degenerados foram descartados do experimento e os demais foram selecionados para a MIV.

### **5.8. Maturação *in vitro* (MIV)**

Depois de selecionados, os oócitos foram transferidos para as placas da maturação, em gotas de 70 $\mu$ L com o meio de maturação (TCM-199 suplementado com 10% de SFB, 5,0 $\mu$ g/mL de FSH, 100 $\mu$ g/mL de hCG, 1,0 $\mu$ g/mL de estradiol, 0,33mM de piruvato, 2mM glutamina, 2,2mg/L bicarbonato de sódio, 16,67 $\mu$ g/mL de amicacina - SIRIAROONRAT et al., 2010 modificado), contendo até dez oócitos por gota. As placas foram incubadas em ar com 5% de CO<sub>2</sub>, na temperatura de 38,5°C, por 24 horas.

### **5.9. Avaliação da maturação nuclear e distribuição mitocondrial**

Após o período de maturação, os oócitos foram corados (coloração MitoTracker Red CMXRos - Molecular Probes, Inc. - Eugene, OR) no intuito de avaliar a distribuição mitocondrial. Para isso, os CCOs foram transferidos para placas com gotas de 70µL de PBS acrescido de 0,1% de hialuronidase e agitados com o uso de uma micropipeta automática até que os oócitos ficassem desnudos. A solução contendo o corante na concentração de 0,5mM/mL foi ressuspensa em meio de lavagem. Uma gota de 70µL foi colocada na placa onde foram depositados os oócitos. Estes foram incubados em estufa em atmosfera úmida, semicontrolada com 5% de CO<sub>2</sub>, na temperatura de 38,5°C, por 30 minutos. Envelopes de papel alumínio foram utilizados para cobrir a placa, a fim de proteger os oócitos com o corante da luz.

Após serem incubados com o MitoTracker Red CMXRos, os oócitos foram lavados em meio de lavagem. Uma gota de 70µL contendo o corante Hoechst 33342 (10ug/ml, Molecular Probes, Inc. - Eugene, OR) diluído em meio TCM 199 Hepes foi colocada em uma placa onde foram depositados os oócitos. Estes foram incubados em estufa em atmosfera úmida, semicontrolada com 5% de CO<sub>2</sub>, na temperatura de 38,5°C, por 20 minutos. Envelopes de papel alumínio foram utilizados para cobrir a placa, a fim de proteger os oócitos com o corante da luz.

Após a incubação em ambos os corantes, os oócitos foram lavados duas vezes em meio de lavagem, e analisados entre lâmina e lamínula (utilizando silicone entre elas para não haver o rompimento da membrana dos oócitos) em uma gota de glicerina na temperatura de 37°C. Os oócitos foram analisados de acordo com o padrão de distribuição mitocondrial, em microscópio de epifluorescência (579-599 nm) e classificados da seguinte maneira: Homogêneos - mitocôndrias distribuídas de maneira dispersa pelo ooplasma; Heterogêneo - mitocôndrias aparecem distribuídas em maior concentração na periferia dos oócitos em relação ao seu centro ou na forma de clusters.

Para avaliar a maturação nuclear, os oócitos foram analisados em microscópio de epifluorescência (330-385nm) e classificados da seguinte maneira: oócitos maduros - oócitos no estágio de MII, onde há um grupo de cromossomos, em posição equatorial envolto por membrana e extrusão do corpúsculo polar;

oócitos imaturos - oócitos com núcleo em qualquer outra configuração nuclear (cromossomos que apresentem a configuração de VG (envoltos pela membrana), GVBD (ausência da membrana, cromossomos caracterizados, cromatinas condensadas), MI (cromossomos condensados em pares), AI (início da separação dos pares, possível observar os fusos) ou TI (grupos cromossômicos iguais, já separados e envoltos por membrana), onde não se observa a presença do corpúsculo polar; oócitos sem cromatina foram classificados como degenerados.

#### **5.10. Avaliação de oócitos não expostos a MIV**

Outras três cirurgias foram realizadas para a colheita de oócitos de fêmeas sincronizadas, que foram avaliados sem passar pela MIV. Estes oócitos foram classificados quanto a sua morfologia e, posteriormente, avaliados conforme os procedimentos descritos acima, para acessar seu status nuclear e mitocondrial.

#### **5.11. Análise estatística**

Para análise dos dados, foi utilizada a estatística descritiva. Os dados referentes a estimulação ovariana são apresentados como média±desvio padrão (DP) do número de folículos visualizados. Os dados referentes à taxa de recuperação oocitária são expressos em porcentagem (%) do número de oócitos colhidos em relação ao número de folículos aspirados. Para a classificação morfológica dos CCO e avaliação da maturação nuclear e citoplasmática, os dados são reportados em termos de porcentagem (%), de acordo com as classificações propostas acima.

A correlação entre o número de folículos visualizados por ultrassom e o número de folículos visualizados por videolaparoscopia, foi analisada pelo teste de correlação de Pearson. A análise foi feita utilizando o software SAS 9.1 (SAS institute, Cary, NC, USA) e valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Resposta ovariana e colheita dos oócitos

No total foram realizados 14 procedimentos cirúrgicos, obtendo 94 oócitos de fêmeas superestimuladas. Para atingir a meta proposta de colheita mínima de 70 oócitos foram necessários 11 procedimentos cirúrgicos (73 oócitos colhidos). Outras três cirurgias foram realizadas, avaliando 21 oócitos logo após a colheita, ou seja, sem que estes passassem pela MIV.

#### 6.1.1. Avaliação ultrassonográfica

A média  $\pm$  DP de folículos visualizados no ultrassom em oito procedimentos cirúrgicos foi de  $12,75 \pm 3,15$ . Na Tabela 1 encontra-se a distribuição dos folículos nas categorias 1, 2 e 3 de acordo com seu diâmetro. O tamanho médio  $\pm$  DP dos ovários também foi obtido com base em seis procedimentos, sendo  $12,05 \pm 2,88$  mm o tamanho do ovário direito e  $13,00 \pm 0,99$  mm do ovário esquerdo.

**Tabela 1** – Dados dos folículos visualizados com o uso da ultrassonografia ovariana realizadas com fêmeas superestimuladas de *M. gouazoubira*.

Categoria	Fol/cir (n)	Ø Fol
1 ( $\geq 4,5$ mm)	$0,75 \pm 0,89$ (6)	$5,33 \pm 0,35$ mm
2 (2,6 - 4,5 mm)	$6,57 \pm 1,90$ (46)	$3,54 \pm 0,33$ mm
3 ( $\leq 2,5$ mm)	$6,14 \pm 4,53$ (43) *	

**Fol/cir** = Média $\pm$ DP do número de folículos por cirurgia por animal, **Ø Fol** = Média $\pm$ DP do diâmetro dos folículos. \*Dados não registrados.

#### 6.1.2. Avaliação videolaparoscópica

Considerando todos os procedimentos cirúrgicos onde os ovários puderam ser visualizados (n=13), a média  $\pm$  DP do número de folículos visualizados com as imagens da videolaparoscopia, do número de folículos aspirados e do número de

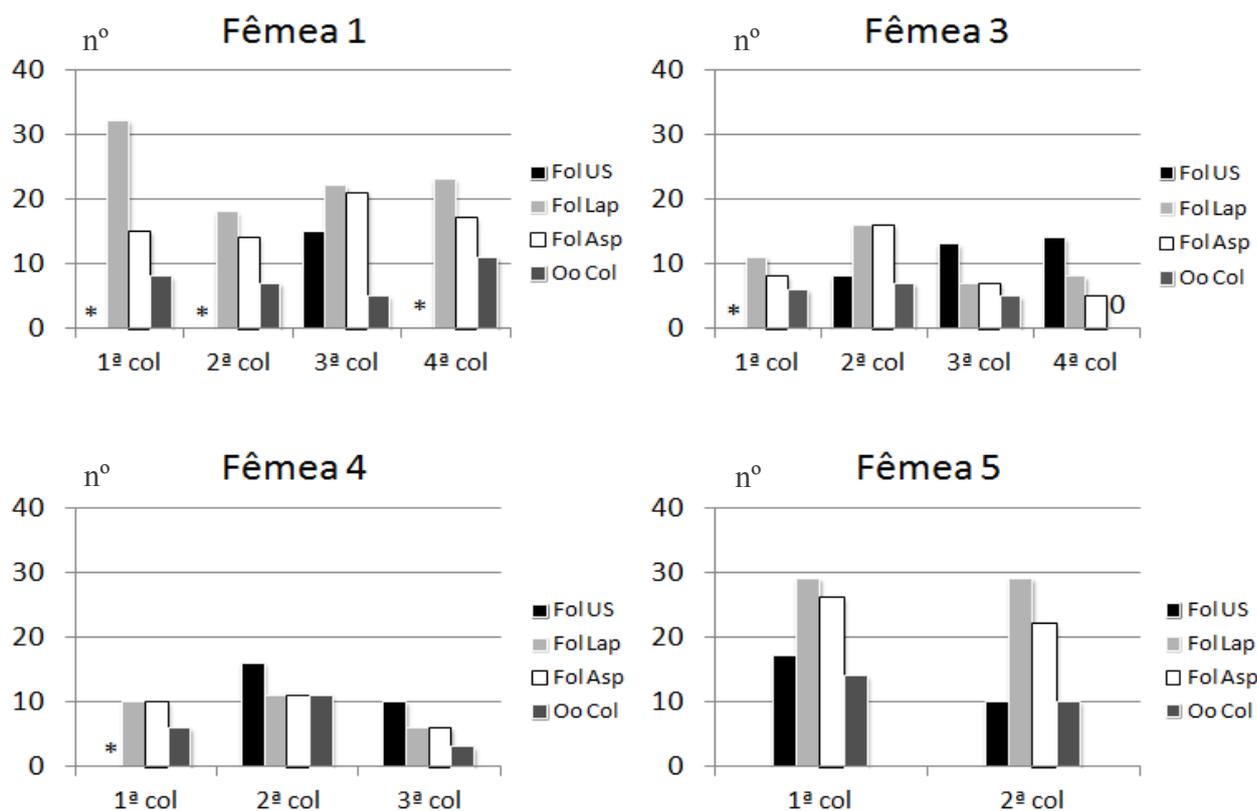
oócitos colhidos a cada cirurgia com cada animal estão apresentadas na Tabela 2. A taxa de recuperação oocitária foi 52,84%.

**Tabela 2** – Média  $\pm$  DP do número de folículos visualizados, dos folículos aspirados e de oócitos colhidos em 13 colheitas por videolaparoscopia em fêmeas superestimuladas de *M. gouazoubira*.

	Total (n)	Ovário Direito (n)	Ovário Esquerdo (n)
<b>Fol Lap</b>	17,07 $\pm$ 9,12 (222)	8,54 $\pm$ 4,59 (111)	8,54 $\pm$ 5,50 (111)
<b>Fol Asp</b>	13,54 $\pm$ 6,64 (176)	7,31 $\pm$ 3,99 (95)	6,23 $\pm$ 3,70 (81)
<b>Oócitos</b>	7,15 $\pm$ 3,72 (93)	-	-

**Total** = Dados dos dois ovários; **Fol Lap** = Folículos visualizados pela videolaparoscopia; **Fol Asp** = Folículos aspirados.

Na Figura 6 estão representados graficamente os folículos visualizados pela ultrassonografia, os folículos visualizados pela videolaparoscopia, os folículos aspirados e o número de oócitos colhidos de cada uma das fêmeas em cada uma das colheitas a que foram submetidas.



**Figura 6** – Representação gráfica do número de as estruturas (**Fol US** = número de folículos visualizados por ultrassom; **Fol Lap** = número de folículos visualizados por videolaparoscopia; **Fol Asp** = número de folículos aspirados; **Oo Col** = número de oócitos colhidos. \* = dados não registrados; 0 = nenhum oócito colhido) de cada uma das fêmeas da espécie *Mazama gouazoubira*, em cada uma das colheitas a que foram submetidas.

Como consequência de aderências, alguns folículos não puderam ser visualizados ou puncionados. A fêmea 2 foi descartada do experimento, pois apresentava ovários completamente envoltos por aderências na primeira cirurgia (07/02/2012) (possivelmente decorrente de uma laparotomia realizada para colheita de embriões em 14/04/2010) e dentre as punções realizadas “às cegas”, um oócito foi colhido, maturado *in vitro* e inserido nas contagens de avaliação morfológica, da maturação nuclear e mitocondrial. Aderências visualizadas na primeira cirurgia da fêmea 4 encobriam parte dos ovários (cerca de um terço da superfície de cada um deles) e na cirurgia subsequente houve aumento da superfície ovariana aderida no ovário esquerdo, porém mais de metade do ovário era visualizada. Nas outras fêmeas, as aderências apareceram a partir do terceiro ato cirúrgico (fêmea 1, com um terço do ovário esquerdo e um quinto no ovário direito aderido, e fêmea 3, com

um quinto do ovário esquerdo aderido). Na quarta cirurgia a que foi submetida, foi visualizado aumento na superfície aderida da fêmea 3 (metade do ovário esquerdo e um quinto do ovário direito).

Em algumas ocasiões, a formação de coágulos causou o entupimento da agulha de aspiração, havendo necessidade de utilizar a pressão máxima do aparelho ( $\approx 530$  mm Hg) para que houvesse a limpeza do circuito.

### 6.1.3. Correlação entre ultrassonografia e videolaparoscopia

A média  $\pm$  DP de folículos/cirurgia de cada fêmea visualizados pela videolaparoscopia durante as oito cirurgias em que houve também a avaliação ultrassonográfica foi de  $14,88 \pm 8,54$ . A correlação entre os dois métodos de visualização folicular foi baixa e não significativa ( $r = -0,13$ ), com  $p = 0,76$ . Na tabela 3 é possível visualizar que na ausência de aderências, o número de oócitos visualizados pela laparoscopia é maior em relação ao número visualizado por ultrassom, enquanto que quando as aderências estão presentes, o número de folículos visualizados é maior na ultrassonografia em relação a videolaparoscopia, com excessão do procedimento 3 da fêmea 1.

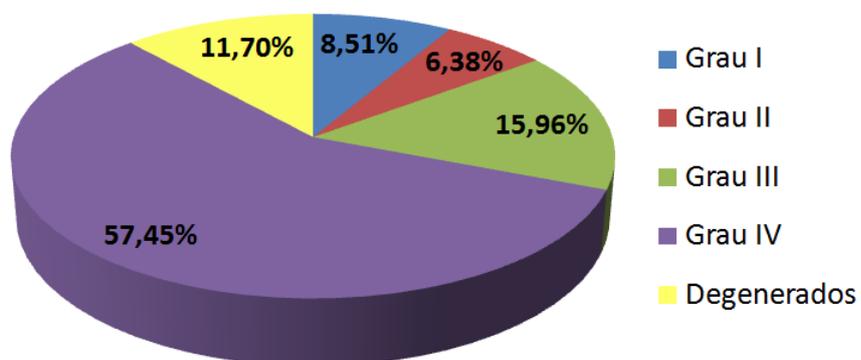
**Tabela 3.** Número de folículos visualizados por ultrassom e por laparoscopia em oito procedimentos de aspiração folicular realizados nas fêmeas superestimuladas da espécie *Mazama gouazoubira*.

Procedimento	FolUS	FolLap	Aderências
2º da fêmea 3	8	16	Não
2º da fêmea 4	16	11	Sim
3º da fêmea 1	14	21	Sim
3º da fêmea 3	13	7	Sim
3º da fêmea 4	10	5	Sim
1º da fêmea 5	17	29	Não
2º da fêmea 5	10	29	Não
4º da fêmea 3	14	8	Sim
<b>Média<math>\pm</math>DP</b>	<b>12,75<math>\pm</math>3,15</b>	<b>15,75<math>\pm</math>9,66</b>	

**Fol US** = Folículos visualizados por ultrassom; **Fol Lap** = Folículos visualizados por videolaparoscopia. Aderências = presença de aderências visualizaadas por videolaparoscopia.

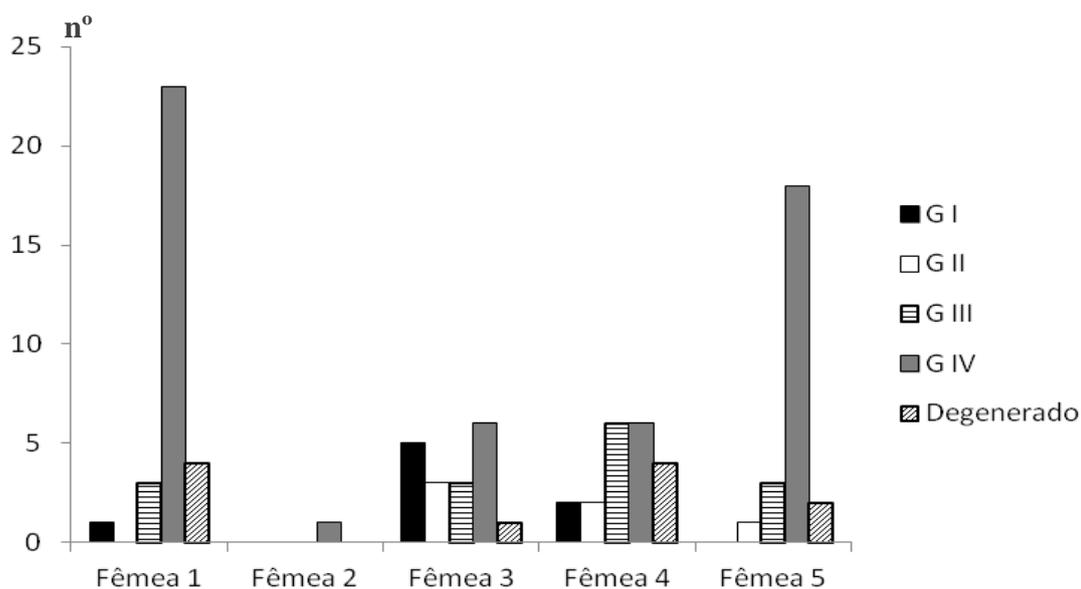
## 6.2. Classificação morfológica dos oócitos

Na Figura 7 encontram-se os valores em porcentagem da classificação morfológica dos 94 oócitos colhidos durante todas as videolaparoscopias (n=14).



**Figura 7** – Representação gráfica da classificação morfológica dos oócitos colhidos (n=94) das fêmeas superestimuladas da espécie *Mazama gouazoubira*. Valores estão expressos em porcentagem (%).

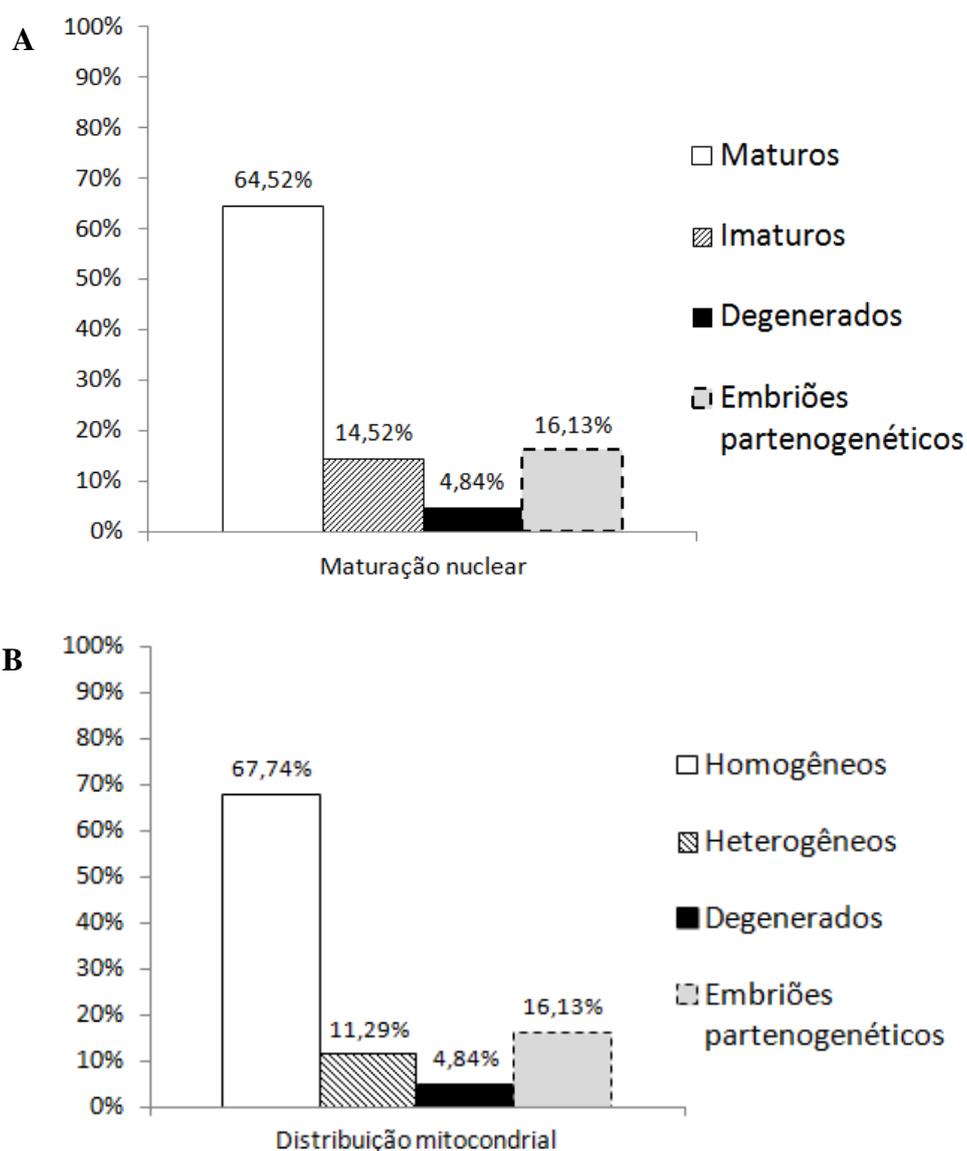
Apesar do alto índice de oócitos desnudos (grau IV) a maioria deles se encontrava com o ooplasma homogêneo. Ainda, na Figura 8 é possível ver a distribuição dos oócitos colhidos de cada indivíduo conforme sua classificação morfológica.



**Figura 8** – Representação gráfica do número total de oócitos colhidos de cada uma das fêmeas superestimuladas da espécie *Mazama gouazoubira* segundo as categorias de classificação morfológica.

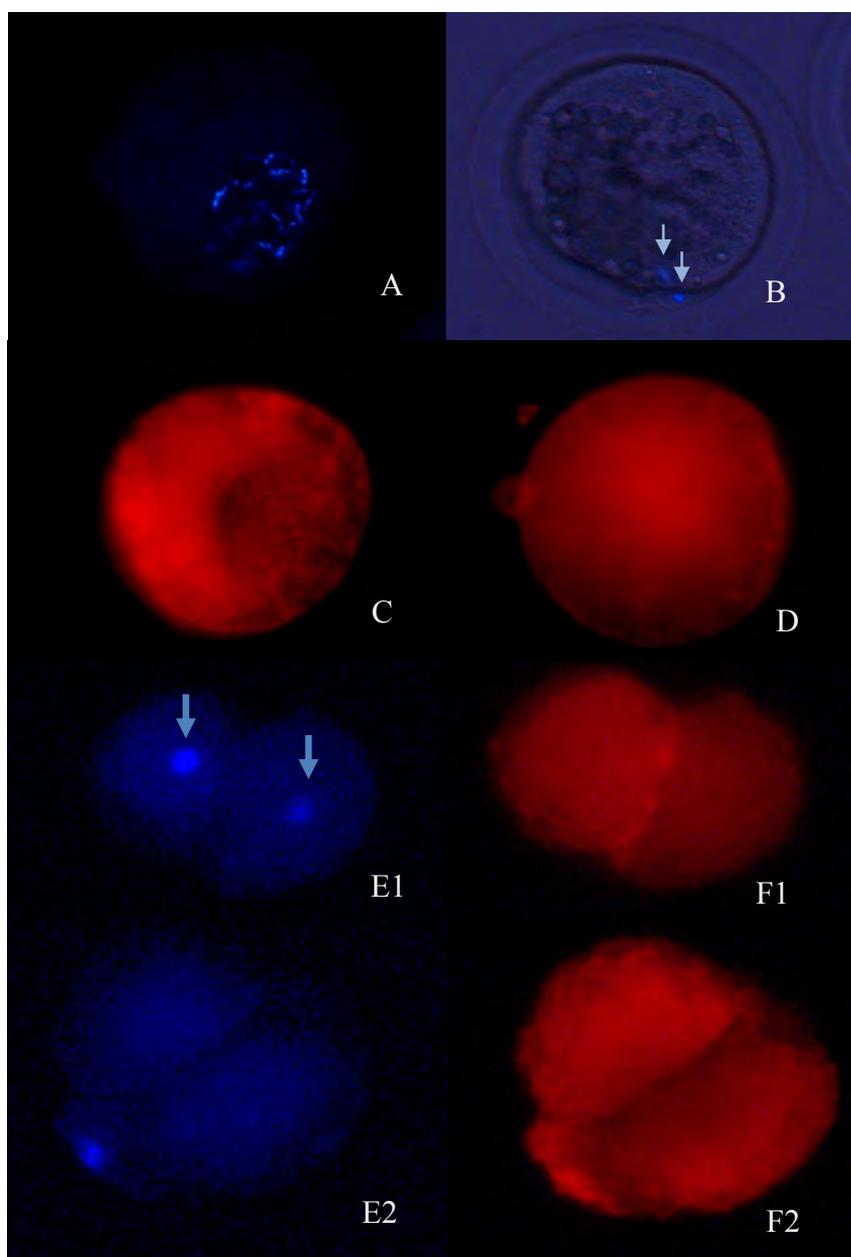
### 6.3. Avaliação dos oócitos maturados *in vitro*

Dos 73 oócitos colhidos durante os 11 primeiros procedimentos, 62 (84,93%) foram selecionados e destinados à MIV. A avaliação da maturação nuclear (maturados, imaturos ou degenerados) e da distribuição das mitocôndrias (homogênea, heterogênea ou degenerados) dos 62 oócitos está representada em porcentagem (%) na Figura 9.



**Figura 9** – Representação gráfica das taxas de maturação nuclear (A) e citoplasmática (distribuição mitocondrial) (B) de 62 oócitos da espécie *M. gouazoubira*, submetidos a MIV.

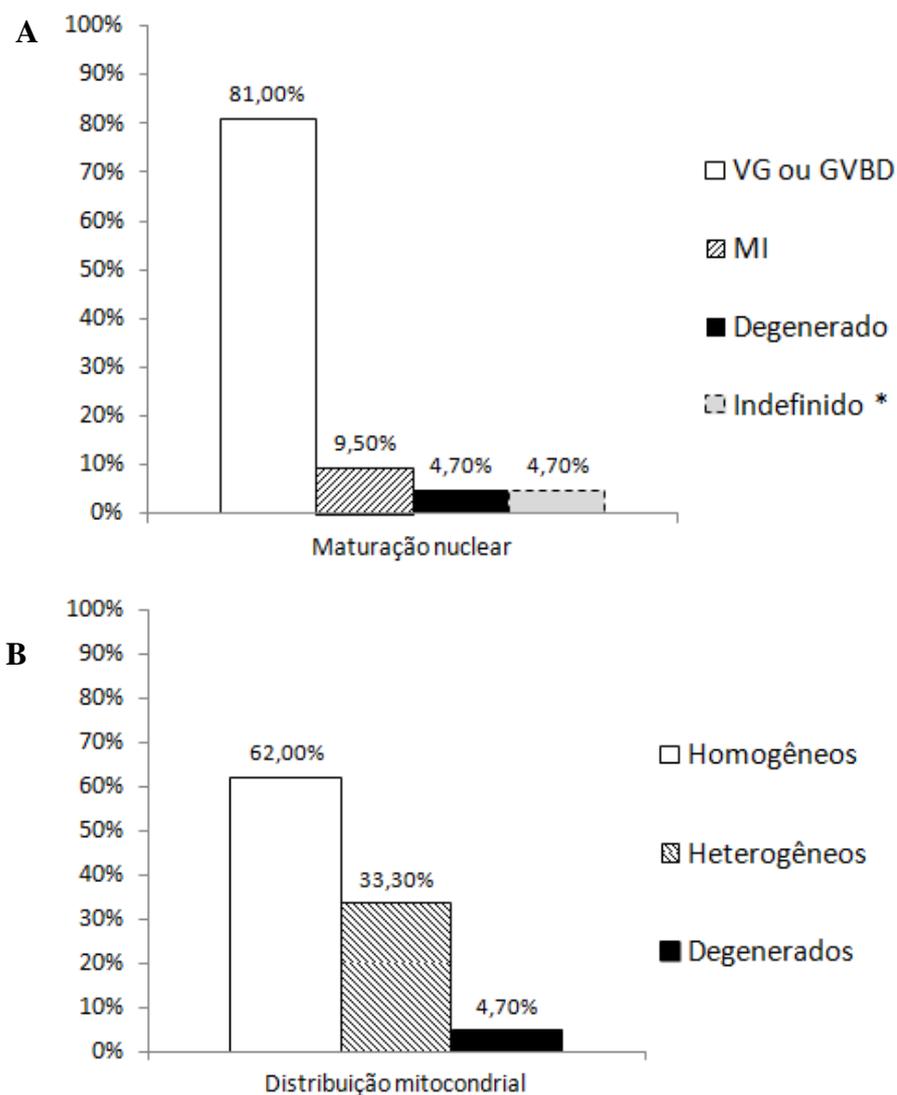
Na figura 10 é possível visualizar algumas micrografias exemplificando a classificação dos oócitos em relação à maturação nuclear e citoplasmática.



**Figura 10** – Oócitos de *M. gouazoubira* corados com Hoescht 333452 (azul) e Mitotracker red CMXRos (vermelho). (A) Oócito com núcleo imaturo (GVBD); (B) Oócito com núcleo maturo (metáfase na seta superior e corpúsculo polar na seta inferior); (C) Oócito com distribuição mitocondrial heterogênea; (D) Oócito com distribuição mitocondrial homogênea; (E1, E2, F1 e F2) Oócitos que sofreram ativação espontânea por partenogênese. Na figura E1 é possível visualizar o núcleo de ambos os blastômeros (setas).

#### 6.4. Avaliação de oócitos não expostos a MIV

Em três cirurgias realizadas para a avaliação de oócitos não expostos a MIV, uma delas não possibilitou a obtenção de nenhum oócito, e as demais resultaram na colheita de 21 oócitos. A avaliação do estádio nuclear e da distribuição das mitocôndrias destes oócitos está representada em porcentagem (%) na Figura 11.



**Figura 11** – Representação gráfica das taxas dos estádios nucleares (A) e da distribuição mitocondrial (B) de 21 oócitos da espécie *M. gouazoubira*, logo após a colheita. **Indefinido \*** = Oócitos que não possibilitaram a definição do estágio nuclear.

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1. Estimulação ovariana

O protocolo hormonal utilizado para induzir a estimulação ovariana na espécie *M. gouazoubira* foi eficiente. A média de folículos visualizados por videolaparoscopia a cada cirurgia ( $17,07 \pm 9,12$ ) foi semelhante às médias descritas para ovinos, onde há uma variação de 10,4 a 14,7 folículos/ovelha (revisado por STANGL et al., 1999) utilizando diferentes protocolos hormonais. Em cervídeos, diferentes protocolos hormonais testados mostraram grande variação do crescimento folicular (3,21 a 15 folículos/animal - ARGO et al., 1994; MORROW et al., 1994; ASHER et al., 1995; BERG et al., 1995; BAINBRIDGE et al., 1996; ASHER et al., 2000). Para *Cervus eldi*, onde também foi utilizado o protocolo de múltiplas aplicações de FSH, obteve-se a média de 18,2 folículos/fêmea (SIRIARONRAT, 2006) e para *M. gouazoubira*, os protocolos de superovulação resultaram em um estímulo folicular total que variou de 1,4 a 13,2, dependendo do protocolo hormonal utilizado, sendo que o protocolo onde as múltiplas aplicações de FSH foram utilizadas resultou em valor mais baixo de estímulo folicular total (10,4) do que o relatado em nosso experimento (ZANETTI, 2009).

Apesar do crescimento folicular satisfatório, talvez uma adequação na dose de FSH seja necessária, uma vez que este valor é semelhante ao utilizado para ruminantes de grande porte (BARUSELLI et al., 2003). A exposição a altas concentrações de FSH pode ter um efeito potencialmente deletério sob o desenvolvimento da competência do oócito (GREVE et al., 1995).

### 7.2. Avaliação ultrassonográfica

Os folículos da categoria 3 e 2 ( $\leq 2,5$  e  $2,6$  a  $4,4$  mm) foram predominantes nas avaliações ultrassonografias deste estudo. Em *C. eldi*, um cervídeo de grande porte, a maioria dos folículos visualizados (média de 12,2 folículos/cirurgia) possuía pequeno diâmetro (entre 4 e 6 mm), enquanto os folículos médios (8 mm de diâmetro) e os maiores que 10 mm, ocorreram em uma média de 4,1 e 1,6 folículos/cirurgia, respectivamente (SIRIARONRAT, 2006).

Foi demonstrado que o tamanho do folículo influencia o potencial de maturação nuclear e citoplasmática do oócito. Estudos em bovinos mostram que não há diferença na taxa de maturação e clivagem de embriões de oócitos que provém de folículos variando de 2 a 8 mm de diâmetro. No entanto, oócitos provenientes de folículos muito pequenos, com cerca de 1 a 2 mm, tem taxas significativamente mais baixas de maturação e clivagem (YANG, 1998).

A relação entre o diâmetro folicular e a obtenção de CCO de boa qualidade (presença de várias camadas compactas de células do cumulus e ooplasma homogêneo) também já foi relatada. Em ovinos, os folículos grandes (5 a 7 mm) resultaram em 77,9% de CCOs de boa qualidade, enquanto que os médios (3 a 5 mm) resultaram em 64,4% (RODRIGUEZ et al., 2006). Já os estudos que relacionam o diâmetro dos folículos com a taxa de recuperação possuem resultados contraditórios. Enquanto Rodriguez et al. (2006) afirmam que o tamanho dos folículos não afeta a taxa de recuperação oocitária por meio da aspiração laparoscópica em ovinos, Seneda et al. (2001) observaram que, em bovinos, as melhores taxas de colheita foram obtidas de folículos menores que 4 mm de diâmetro, e Pieterse et al. (1991) obtiveram melhores taxas de recuperação em folículos pequenos (3 a 5 mm) e médios (6-10 mm) em relação aos folículos grandes (>10mm).

Em nosso estudo, a grande quantidade de folículos das categorias 3 e 2 resultou em taxas aceitáveis de recuperação e maturação oocitária, no entanto, também foi obtida uma grande quantidade de CCOs desnudos, conforme discutido adiante.

### **7.3. Avaliação videolaparoscópica**

A taxa de recuperação de oócitos por laparoscopia varia muito entre os pequenos ruminantes domésticos (de 40 a 90% para ovinos - COGNIÉ et al., 2004; MORTON et al., 2005; RODRIGUEZ et al., 2006; COX & ALFARO, 2007; GIBBONS et al., 2007; TEIXEIRA, 2010 e de 33 a 80% para caprinos – revisto por ABDULLAH et al., 2008). Para cervídeos essa variação é menor (de 46 a 71% - LOCATELLI et al., 2006; SIRIAROONRAT, 2006; COMIZZOLI et al., 2001; BAINBRIGDE et al., 1999), com valores próximos ao do presente estudo (52,84%).

Alguns folículos que foram visualizados não puderam ser puncionados pois, assim como descrito por Cordeiro (2006), o sangramento de alguns folículos, principalmente dos maiores, sobre os menores, impediram a sua posterior localização para aspiração. Além disso, o acesso a folículos que se encontravam em posições desfavoráveis para a aspiração e a luz do endoscópio refletindo na superfície ovariana, camuflando a presença de alguns folículos, especialmente os menores, foram fatores que dificultaram a aspiração de todos os folículos visíveis.

O número de oócitos obtidos no presente estudo ( $7,15 \pm 3,72$  oócitos/fêmea a cada cirurgia) é semelhante ao relatado por outros autores. Para ovinos esse número varia de quatro a 10 oócitos por doadora (ALBERIO et al., 2002; GIBBONS et al., 2007), enquanto, para caprinos a variação é de 5,6 a 13,4 oócitos por cabra (revisado por ABDULLAH et al., 2008). Para *C. eldi* (SIRIAROONRAT, 2006) e *C. nippon* (COMIZZOLI et al., 2001) foram colhidos 13,4 oócitos/fêmea e nove oócitos/fêmea, respectivamente. Ainda para a espécie *C. nippon*, já foi relatada uma variação de 1,7 a 5,6 oócitos/fêmea, dependendo da estação do ano (LOCATELLI et al., 2006).

A quantidade de oócitos colhidos a cada cirurgia pode ter sido influenciado pelas aderências observadas nos ovários, uma vez que a área aderida poderia encobrir alguns folículos, o que afeta também a avaliação do protocolo de estimulação ovariana. Em ovinos, Teixeira (2010) não observou a formação de aderências, utilizando somente solução de NaCl a 0,9% para banhar os ovários após cada procedimento, enquanto que Stangl et al. (1999) relataram aderências uni e bilaterais nos ovários de ovelhas submetidas a dez sessões de aspiração folicular com intervalo semanal, onde não foi realizada a lavagem dos ovários. Cordeiro (2006) realizou colheitas semanais em caprinos e relatou que a lavagem dos ovários com o líquido de colheita (PBS acrescido de heparina) foi eficaz, uma vez que apenas 15% dos animais apresentaram aderências, predominantemente a partir da quarta cirurgia.

No entanto, para este experimento, a lavagem dos ovários com PBS acrescido de heparina não foi suficiente para evitar a ocorrência de aderências, que ocorreram predominantemente a partir da terceira cirurgia. Esse é um problema importante, uma vez que não só diminui a quantidade de folículos visualizados e

passíveis de serem aspirados, como também inviabiliza a repetibilidade da técnica para a obtenção de oócitos, dependendo da extensão da aderência sobre o ovário. Foi notada a suscetibilidade dos animais deste experimento a formação de aderências, bem como a formação de redes fibrosas, que dificultam a aspiração dos folículos. Essas redes fibrosas ao redor do órgão foram reportadas anteriormente por Gibbons et al. (1994) em vacas aspiradas por ultrassom.

Para minimizar este problema, talvez pudesse ser realizada a retirada de coágulos já formados da cavidade abdominal. Ainda, poderiam ser utilizados outros métodos como as barreiras físicas em forma de gel ou filmes, ou soluções que permitam a flutuação dos órgãos intrabdominais por tempo prolongado, de forma que fiquem afastados entre si (ARAUJO et al., 2006).

#### **7.4. Correlação entre ultrassonografia e videolaparoscopia**

Apesar de apresentarem médias com valores muito semelhantes, as duas formas de visualização dos folículos obtiveram correlação baixa e não significativa. Alguns fatores podem ter contribuído para este resultado como: o fato do ultrassom não identificar estruturas menores do que 2mm, que por sua vez podem ser visualizadas por laparoscopia; problemas técnicos referentes às imagens obtidas na laparoscopia, como o reflexo da luz do endoscópio, que poderia camuflar a presença de alguns folículos, ou ainda a produção de sombras que poderiam ser confundidas com folículos; e ainda a presença de aderências, que poderiam impedir a visualização por laparoscopia de algum folículos encobertos, mas que poderiam ser identificados por meio do ultrassom. Um indício de que os folículos podem ter sido encobertos por aderências se relaciona ao fato de que na presença de aderências um menor número de folículos foram visualizados pela videolaparoscopia em relação ao ultrassom, e na sua ausência o contrário foi observado.

#### **7.5. Morfologia oocitária**

Apesar da grande quantidade de oócitos grau IV (desnudos), a maioria deles apresentou ooplasma homogêneo, indicando boa qualidade oocitária e, portanto, possibilidade de inadequações da técnica de aspiração. É provável que o

desnudamento seja decorrente da pressão da bomba de vácuo e/ou do diâmetro da agulha utilizada, já que estes parâmetros podem afetar a morfologia oocitária (BOLS et al., 1996). Cordeiro (2006) também relata a ocorrência de tais problemas técnicos em caprinos, pois mesmo reduzindo a pressão do vácuo e encurtando a linha de aspiração, visando diminuir o desnudamento e o rompimento de oócitos, houve grande quantidade de oócitos classificados como grau III ou grau IV.

Em cervídeos os estudos utilizaram pressões mais baixas, variando de 25 a 34 mmHg. Entretanto, o calibre das agulhas utilizadas era maior, em relação ao nosso experimento, sendo utilizadas agulhas de 16, 17, 19 e 20G (SIRIARONRAT, 2006; LOCATELLI et al., 2006; COMIZZOLI et al., 2006; BAINBRIGDE et al., 1999)

Fry et al. (1997) observaram que agulhas de calibres maiores que 17G não são práticas para o uso em pequenos folículos. Uma vez que trabalhamos com pequenos ruminantes, que possuem folículos de menor tamanho seria interessante o uso de agulhas de menor calibre, visando a aspiração de um maior número de folículos. O uso de agulhas mais finas aumenta a velocidade do fluxo do líquido e diminui a turbulência nos encaixes dos instrumentos. No entanto, há uma maior tendência de obstrução por coágulos de sangue, e para a desobstrução seria necessário aumentar o vácuo, o que muitas vezes acarreta prejuízo à qualidade dos oócitos colhidos (RENOU et al., 1981). A ocorrência da obstrução da agulha e necessidade de aumento do vácuo para limpar o circuito foi observada neste experimento, e pode ter contribuído para a obtenção da grande quantidade de oócitos desnudos, e também pode explicar em parte a maior quantidade desses oócitos de grau IV nas fêmeas 1 e 5 em relação as demais.

A pressão (mmHg) e o fluxo (mL água/minuto) são aspectos físicos importantes da aspiração folicular com agulha acoplada à bomba a vácuo e estão diretamente relacionados à eficiência da recuperação de CCOs (CROCOMO et al., 2012). Para ovinos, Baldassarre et al. (2003) e Koeman et al. (2003) consideram que pressões entre 50 a 70 mmHg são valores ótimos para o ajuste da bomba a vácuo, enquanto que para o fluxo é indicado a utilização de valores entre 6,5 e 10 mL água/minuto (ALVAREZ et al. 1999; RODRÍGUEZ et al.2000; ALBERIO et al. 2001). Entretanto, um estudo mais recente afirma que as condições

ideais para a aspiração são o uso de fluxo variando entre 10 e 20 mL de água/minuto, um sistema de aspiração com diâmetro de 1 a 2mm e o uso de agulhas curtas, independentemente do seu calibre (RODRIGUEZ et al., 2006). O presente estudo obteve altas taxas de oócitos desnudos mesmo estando dentro das condições citadas acima. Apesar do fluxo utilizado (11mL água/minuto) estar dentro dos valores ideais, quando consideramos apenas a pressão, observamos que o valor utilizado foi superior aos recomendados pela literatura. Portanto, o ajuste da pressão para valores mais baixos pode auxiliar na obtenção de oócitos de melhor qualidade.

#### **7.6. Avaliação dos oócitos maturados *in vitro*.**

O estudo sobre a dinâmica nuclear dos oócitos de *M. gouazoubira* demonstrou que é necessário um período de MIV de 20 a 25 horas, para que mais de 50% dos oócitos atinjam a MII (CURSINO et al., 2009). Para *C. elaphus* 24 e 27 horas de cultura foram necessárias para que respectivamente 50 e 75% dos oócitos atingissem MII (BERG et al., 2002). Nosso estudo corrobora com estes resultados, uma vez que 24 horas possibilitou a maturação nuclear de mais de 50% dos oócitos maturados *in vitro*.

Em cervídeos a MIV por 24 h resulta em taxas que variam de 50 a 78% de oócitos em MII (SIRIAROONRAT et al., 2010; BERG et al., 2002; COMIZZOLI et al., 2001; KROGENAES et al., 1994). No entanto, estes trabalhos descartam o uso de oócitos desnudos para a MIV, uma vez que estes são considerados de baixa qualidade e com habilidade reduzida para completar a maturação meiótica (WARRIACH et al., 2004). Leibfried e First (1979) demonstraram que para bovinos apenas 44% dos oócitos desnudos maturam *in vitro* contra 71% em oócitos revestidos pelas células do cumulus. Apesar da maioria dos oócitos do nosso estudo ser classificada como desnudo, a porcentagem de oócitos que atingiram MII (64,52%) encontra-se dentro dos valores descritos pela literatura. Portanto, é provável que fossem encontradas melhores taxas de maturação caso trabalhássemos somente com oócitos revestidos por células do cúmulus.

A inclusão do estradiol na MIV de oócitos pode ser benéfico em alguns casos (YOUNIS et al., 1989; SIROTKIN, 1992) ou deletério em outros (BEKERVAN WOUDEBERGE et al., 2004). Utilizando um meio de maturação semelhante ao do presente estudo, para a espécie *O. virginianus* a adição de estradiol ao meio de cultura exerceu influência positiva sob as taxas de maturação nuclear. No entanto, os autores ressaltam que este benefício foi válido apenas para oócitos grau I, sendo que aqueles com pior classificação morfológica (grau II e grau III) não obtiveram diferenças na taxa de maturação quando cultivados em meio com ou sem o estradiol (SIRIAROONRAT et al., 2010). Em nosso estudo, devido ao resultado satisfatório da maturação nuclear, podemos concluir que o meio utilizado também foi eficiente para a maturação de oócitos de graus inferiores (grau II, III e IV) e que, possivelmente, o estradiol tem efeito benéfico para a maturação dos oócitos de *M. gouazoubira*.

Quanto à distribuição mitocondrial, é possível dizer que os dados colhidos não foram conclusivos. Isso se deve ao fato de que não foi possível visualizar a correta posição das mitocôndrias. Para obter uma avaliação segura, seria indicado analisar os oócitos utilizando a microscopia confocal, que possibilitaria a visualização de cortes ópticos e, portanto, a visualização da posição das mitocôndrias com maior objetividade, uma vez que não haveria sobreposição e emissão de fluorescência de todas as mitocôndrias em uma só imagem.

No presente estudo foi observada uma porcentagem relativamente alta de oócitos ativados espontaneamente por partenogênese, e esclarecer esta questão seria importante para tentar corrigi-la e, assim, aumentar a quantidade de oócitos disponíveis para FIV.

A maturação inadequada do oócito, seja do núcleo ou do citoplasma, inviabiliza a fecundação e aumenta a ocorrência de polispermia, partenogênese e bloqueio do desenvolvimento embrionário (XU; BRACKET, 1988). Apesar da maturação *in vitro* por 24 horas ser o ideal para a maioria das espécies de cervídeos, talvez o tempo ideal para *M. gouazoubira* seja mais curto do que o testado neste trabalho. Sabe-se que a cultura prolongada pode levar o oócito a envelhecer e, com isso, aumentar sua sensibilidade aos estímulos de ativação decorrentes da manipulação e da cultura (ALBERTINI et al., 2003). Existe uma

grande quantidade de estímulos físicos (manipulação, choque térmico, elétrico ou osmótico) e químicos (exposição a certas enzimas, íons anestésicos, alcoóis e inibidores da síntese de proteína) que sabidamente induzem a ativação partenogenética em algumas espécies (GRAHAM, 1974). Os oócitos deste estudo podem ter sido expostos inadvertidamente a um ou mais desses estímulos, ou outros que não são conhecidos para a espécie.

Outra explicação pode estar ligada a atividade da histona H1K, uma vez que foi encontrada correlação entre a ativação partenogenética dos oócitos e os níveis basais de atividade da H1K (BARNES et al, 1993; COLLAS et al, 1993). Estes níveis basais de atividade da H1K foram encontrados em oócitos envelhecidos de suínos após passaram pela MIV prolongada (KIKUCHI et al., 1995). Ainda, em 25% dos oócitos de bovinos provenientes de folículos pequenos (menores que 2 mm), níveis reduzidos de H1K também foram encontrados (YANG et al., 1997). Ledda (1997) verificou ativação partenogenética de 19% dos oócitos de ovelhas pré-puberes, contra 2% em oócitos de fêmeas adultas, e este fato foi associado à predominância de folículos entre 1-2 mm de diâmetro nas fêmeas pré-puberes. Assim, tanto oócitos envelhecidos, quanto provenientes de folículos pequenos tendem a ter baixos níveis de atividade da H1K, tornando estes gametas mais suscetíveis à ativação espontânea por partenogênese.

### **7.7. Avaliação de oócitos não maturados *in vitro***

A identificação do status dos oócitos logo após a colheita é um fator importante, pois caso os oócitos estivessem maturando *in vivo* e, posteriormente, passassem pelo cultivo *in vitro*, envelheceriam e, portanto, teriam baixo potencial para produção de embriões. Neste estudo, a avaliação dos oócitos permitiu confirmar que não houve maturação *in vivo*, uma vez a maioria deles se encontravam em estágio de VG ou GVBD. Apesar da quantidade de oócitos classificados com distribuição homogênea das mitocôndrias, a classificação desses oócitos pelo microscópio de epifluorescência não foi considerada segura conforme discutido anteriormente, e por isso deve ser descartada.

## 8. CONCLUSÕES

1. O protocolo hormonal utilizado para estimulação ovariana produziu uma boa resposta de crescimento folicular, possibilitando a aspiração de folículos da espécie *M. gouazoubira*.
2. A laparoscopia foi uma técnica eficaz para a aspiração de folículos e colheita de oócitos, no entanto provocou aderências que encobriram parte dos ovários e desnudamento de mais de metade dos oócitos colhidos nas condições do presente estudo e, portanto, necessita de ajustes.
3. O meio de maturação utilizado pode ser considerado um meio adequado para a maturação nuclear dos oócitos da espécie *M. gouazoubira*. No entanto, não foi possível avaliar corretamente a distribuição mitocondrial com o método proposto.

## 9. REFERÊNCIAS

ABDULLAH, R.B.; LIOW, S.L.; RAHMAN, A.N.M.A; CHAN, W.K.; WAN-KHADIJAH, W.E.; NG, S.C. Prolonging the interval from ovarian hyperstimulation to laparoscopic ovum pick-up improves oocyte yield, quality, and developmental competence in goats. **Theriogenology**, v. 70, p. 765–771, 2008.

ADONA, P. R.; PIRES, P. R.; QUETGLAS, M. D.; SCHWARZ, K. R.; LEAL, C. L. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 108, p. 49–65, 2008.

ADONA, P. R; LEAL, C. L. V. Efeito de concentração e tempo de exposição à butirolactona I na progressão da meiose de oócitos bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte v. 58, n. 3, p. 354-359, 2006.

AGRAWAL, K. P.; SHARMA T.; SEXENA C.; SHARMA N. Chronology of first meiotic events of caprine oocytes matured in-vitro. **Indian J Anim Sci**, v. 65, p. 285–288, 1995.

AL-AGHBARI, A. M.; MENINO, A. R. Survival of oocytes recovered from vitrified sheep ovarian tissues. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 71, p. 101–110, 2002.

ALBERIO, R. H.; ECHEGOYEN, E.; OLIVERA, J.; ROCHE, A.; ALABART, J.; FERNÁNDEZ-ARIAS, A.; FOLCH, J. Performance in an OPU program of FSH stimulated or nonstimulated Romanov and Rasa aragonesa ewe breeds. **Theriogenology**, v. 55, p. 509, 2001.

ALBERIO, R.; OLIVERA, J.; ROCHE, A. et al. Performance of a modified ovum pick-up system using three different FSH stimulation protocols in ewes. **Small Ruminant Research**, v.46, p.81-87, 2002.

ALVAREZ, M.; ANEL, L.; ANEL, E.; RODRÍGUEZ, C.; KAABI, M.; BOIXO, J.; DE PAZ, P.; OLMEDO, J. Efficiency of laparoscopic follicular aspiration in sheep. **Theriogenology**, v. 51, p. 432, 1999.

ALVES, D. F.; RAUBER, L. P.; RUBIN, F. B.; BERNARDI, M. L.; DEZEN D.; SILVA, C.A.M; RUBIN M.I.B. Desenvolvimento embrionário in vitro de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular ou TCM-hepes. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 40, p. 279-286, 2003.

ARAUJO, S. E. A.; CARAVATTO, P. P. P.; CHANG, A. J. B. A.; CAMPOS, F. G. C. M.; SOUSA, M. Impacto da Vídeo-Cirurgia na Prevenção de Aderências. **Rev bras Coloproct**, v. 26(2), p. 208-216, 2006.

ARGO, C. M.; JABBOUR, H. N.; GODDARD, R.; WEBB, R.; LOUDON, A. S. I. Superovulation in red deer (*Cervus elaphus*) and Père David's deer (*Elaphurus*

*davidianus*), and fertilization rates following artificial insemination with Père David's deer semen. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v. 100, p. 629-636, 1994.

ASHER, G. W.; BERG, D. K.; EVANS, G. Storage of semen and artificial insemination in deer. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, p.195-211, 2000.

ASHER, G. W.; FISHER, M. W.; JABBOUR, H. N.; SMITH, J. F.; MULLEY, R. C.; MORROW, C. J.; VELDHUIZEN F. A.; LANGRIDGE, M. Relationship between the onset of oestrus, the preovulatory surge in luteinizing hormone and ovulation following oestrus synchronization and superovulation of farmed red deer (*Cervus elaphus*). **J Reprod Fert**, Cambridge, v. 96, p. 261-273, 1992.

ASHER, G. W.; JABBOUR H. N.; THOMPSON, J. G.; TERVIT, H. R.; MORROW, C. J. Superovulation of farmed red deer (*Cervus elaphus*) and fallow deer (*Dama dama*): Incidence of ovulation and changes in plasma hormone concentrations during the pré-ovulatory period in relation to ova recovery and fertilization. **Anim. Repro. Sci.**, Amsterdam, v. 38, p. 137-154, 1995.

ASHER, G. W.; MONFORT, S. L.; WEMMER, C. Comparative reproductive function in cervids: implications for management of farm and zoo populations. **J Reprod Fertil Suppl**, Cambridge, v. 54, p. 143-56, 1999.

ASHER, G. W.; O'NEILL, K. T.; SCOTT, B. G.; MOCKETT, B. G. PEARSE, A. J. Genetic influences on reproduction of female red deer (*Cervus elaphus*) (2) Seasonal and genetics effects on the superovulatory response of exogenous FSH. , **Anim. Repro. Sci.**, Amsterdam, v. 59, p. 61-70, 2000.

ÁVILA-PIRES, F. D. As formas sul-americanas do "veado-virá". **An. Acad. Bras. Ciên.**, Rio de Janeiro, v. 31, p. 547-556, 1959.

BAINBRIDGE, D. R. J., CATT, S. L.; EVANS, G. e JABBOUR, H. N. Successful in vitro fertilization of in vivo matured oocytes aspirated laparoscopically from red deer hinds (*Cervus elaphus*). **Theriogenology**, New York, v. 51, p. 891-898, 1999.

BAINBRIDGE, D. R. J.; CHAPPLE, D.; LOUDON, A. S. I.; JABBOUR, H. N. Immunoneutralization with a monoclonal antibody attenuates the superstimulatory effects of PMSG on endocrine and ovarian responses in red deer (*Cervus elaphus*). **Theriogenology**, New York, v. 43, p. 1339-1350, 1995.

BAINBRIDGE, D. R. J.; HUNTER, M. G.; CHAPPLE, D. G; FLINT, A. P. F.; JABBOUR, H. N. Role of estrogen and prostaglandin F<sub>2α</sub> in premature luteal regression in monovulatory and superovulated Red Deer (*Cervus elaphus*). **Biol. Reprod.**, Champaign, v. 54, p. 347-354, 1996.

BAINBRIDGE, D. R.; JABBOUR, H. N. Potential of assisted breeding techniques for the conservation of endangered mammalian species in captivity: a review. **Vet Rec**, London, v. 143, p. 159-168, 1998.

BALDASSARRE, H.; FUMUS, C. C.; MATOS, D. G.; PESSI, H. In vitro production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. **Theriogenology**, New York, v. 45, p. 707- 717, 1996.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; GAUTHIER, M.; NEVEU, N.; LAPOINTE, J.; SNEEK, L.; LEDUC, M.; DUGUAY, F.; ZHOU, J. F.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C.N. Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. **Theriogenology**, v.59, p.831-839, 2003.

BARIL, G.; REMY, B.; VALLET, J.C.; BECKERS, J.F. Effect of repeated use of progesterone-PMSG treatment for estrus control in dairy goats out of the breeding season. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 27, p. 161–168, 1992.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; REIS, E. L.; NASSER, L. F. T.; SILVA, R. C. P.; MENEGATTI, J. A. ET AL. Adequação da dose de FSH (Follitropin-V) em protocolos de superovulação de vacas nelore (*Bos taurus indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo. **Acta Sci Vet**, v. 31(1), p. 244–5, 2003.

BEHALOVA, E.; GREVE, T. Penetration rate of cumulus enclosed versus denuded bovine eggs fertilized in vitro. **Theriogenology**, New York, v. 39, 186 abstr. 1993.

BEKER-VAN WOUDEBERG, A. R.; VAN TOL, H. T. A.; ROELEN, B. A. J.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. Estradiol and its membrane-impermeable conjugate (estradiol-bovine serum albumin) during in vitro maturation of bovine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation, cytoskeleton, and embryo quality. **Biol Reprod**, v. 70, p. 1465–74, 2004.

BERG, D. K. e ASHER, G. W. New developments reproductive technologies in deer. **Theriogenology**, New York, v. 59, p. 189-205, 2003.

BERG, D. K.; THOMPSON, J. G.; PUGH, P. A.; TERVIT, H. R.; ASHER, G. W. Successful in vitro culture of early cleavage stage embryos recovered from superovulated red deer (*Cervus elaphus*). **Theriogenology**, Stoneham, v. 44, p. 247-254, 1995.

BERG, D. K.; THOMPSON, J.G.; ASHER, G. W. Development of in vitro embryo production systems for red deer (*Cervus elaphus*). Part 2: The timing of in vitro nuclear oocyte maturation. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 70, p. 77-84, 2002.

BERG, D. K.; THOMPSON, J.G.; PETERSON, A.J.; ASHER, G.W. The temporal relationship between oocyte maturation and early fertilisation events in relation to the pre-ovulatory LH peak and preimplantation embryo development in red deer (*Cervus elaphus*), **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 105, n. 3-4, p. 332-343, 2008.

BERGALLO, H. G.; ROCHA, C. F. D.; ALVES, M. A. S.; VAN SLUYS, M. **A fauna ameaçada de extinção no Estado do Rio de Janeiro**. EDUERJ. 166p, 2000.

BERLINGER, F.; LEONI, G.; BOGLIOLO, L.; PINTUS, P.P.; ROSATI, I.; LEDDA, S.; NAITANA, S. FSH different regimes affect the developmental capacity and cryotolerance of embryos derived from oocytes collected from ovum pick-up in donor sheep. **Theriogenology**, Stoneham, v.61, p. 1477-1486, 2006.

BERLINGUER, F.; LEONI, G.; BOGLIOLO, L.; PINTUS, P. P.; ROSATI, I.; LEDDA, S.; NAITANA, S. FSH different regimes affect the developmental capacity and cryotolerance of embryos derived from oocytes collected by ovum pick-up in donor sheep. **Theriogenology**, New York, v. 61, p. 1477–1486, 2004.

BIRLER, S.; PABUCCUOGLU, S.; ALKAN, S.; OZDAS, O. B.; ATALLA, H.; ILERI, I. K. Development of in vitro derived sheep embryos to the blastocyst stage. **Turk J Vet Anim Sci**, Ankara, v. 26, p. 891–894, 2002.

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

BO, G. A.; ADAMS, G. P.; NASSER, L.F.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT. R.J. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. **Theriogenology**, New York, v. 40, n. 2, p. 225-239, 1993.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R. J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, New York, v. 43, p. 31-40, 1995.

BOLS, P. E. J.; VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M. T.; VANDENHEEDE, J. M. M.; KRUIF, D. E. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and development capacity of bovine oocytes. **Theriogenology**, New York, v. 45, p. 1001-1014, 1996.

BOLS, P. E. J.; VAN SOOM, A.; VANROOSE, G.; KRUIF, A. de. Transvaginal oocyte pick-up in infertile Belgian Blue donor cows: preliminary results **Theriogenology**, New York, v. 45, p. 359, 1996b.

BUBENIK, G. A.; BROWN, R.D.; SCHAMS, D. Antler cycle and endocrine parameters in male axis deer (*Axis axis*): seasonal levels of LH, FSH, testosterone and prolactin and results of GnRH and ACTH challenges tests. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 99, n. 4, p. 645-650, 1991.

CHIAN, R. C.; NIWA, K. Effect of cumulus cells present during different periods of culture on maturation in vitro of bovine oocytes. **Theriogenology**, New York, v. 41, p. 176, 1994.

COGNIE, Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. **Theriogenology**, New York, v. 51, p. 105-116, 1999.

COGNIÉ, Y.; POULIN, N.; LOCATELLI, Y.; MERMILLOD, P. State of the art production, conservation and transfer of in vitro produced embryos in small ruminants. *Reproduction*. **Fertility and Development**, Geneva, v. 16, p. 437-445, 2004.

COMIZZOLI, P.; MERMILLOD, P.; COGNIÉ, Y.; CHAI, N.; LEGENDRE, X.; MAUGET, R. Successful in vitro production of embryos in red deer (*Cervus elaphus*). **Theriogenology**, New York, v. 55, p. 649-659, 2001.

COMIZZOLI, P.; MERMILLOD, P.; MAUGET, R. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. **Reprod Nutr Dev**, Penicuik v. 40, p. 493-504, 2000.

CORDEIRO, M. F. Avaliação da laparoscopia na aspiração folicular em fêmeas caprinas pré-púberes e adultas com ou sem estimulação ovariana hormonal. 76 p. **Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)**, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, São Paulo, 2006.

COX, J. F.; ALFARO, V. In vitro fertilization and development of OPU derived goat and sheep oocytes. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 42, p. 83-87, 2007.

CROCOMO, L. F.; MARQUES FILHO, W. C.; LANDIM ALVARENGA, F. C.; BICUDO, S. D. Peculiaridades da coleta de oócitos para produção in vitro de embriões ovinos **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.36, n.1, p.25-31, 2012.

CROSBY, I. M.; OSBORN, J. C.; MOOR, R. M. Changes in protein phosphorylation during maturation of mammalian oocytes in vitro. **J Exp Zool**, v. 229, p. 459-466, 1984.

CURSINO, M. S. Presença de isolamento pós-zigótico entre Diferentes citótipos de mazama americana :Avaliação de fêmeas. 69p. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)**, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, São Paulo, Jaboticabal, 2011.

CURSINO, M. S.; ZANETTI, E. S.; SARAIVA, N. Z.; DUARTE J. M. B. Dinâmica nuclear de oócitos de Veado-Catingueiro (*Mazama gouazoubira*) maturados in vitro. In: **XVIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 2009, Belo Horizonte, Anais eletrônicos... Belo Horizonte: CBRA, 2009. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/eventos/cbra18/Posters.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2013.

DAVIDSON, A. P.; STABENFELDT, G. H. Controle do desenvolvimento das gônadas e dos gametas. In: CUNNINGHAM, J. G. (Ed.). **Tratado de fisiologia veterinária**. 2º ed., Rio de Janeiro: Ed.Guanabara, p. 353-360, 1999.

DUARTE, J. M .B.; GARCIA, J. M. Reprodução assistida em Cervidae brasileiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 19, n. 1-2, p. 111-121, 1995.

DUARTE, J. M. B. Captive Management. In: DUARTE, J. M. B. e GONZÁLES, S. (Eds.). **Neotropical Cervidology: Biology and medicine of Latin American deer**. Jaboticabal, Brasil: Funep and Gland, Switzerland: IUCN, p.240-247, 2010.

DUARTE, J. M. B. Coleta, conservação e multiplicação de recursos genéticos em animais silvestres: o exemplo dos cervídeos. **Agrociência**, v.9(1-2), p.541-544, 2005.

DUARTE, J. M. B. **Guia de identificação dos cervídeos brasileiros**. Jaboticabal: FUNEP, 14p. 1996.

DUARTE, J. M. B.; GARCIA, J. M. Tecnologia da Reprodução para Propagação e Conservação de Espécies Ameaçadas de Extinção. In: DUARTE, J. M. B. (Ed.). **Biologia e conservação de cervídeos Sul-Americanos: *Blastocerus*, *Ozotocerus* e *Mazama***. Jaboticabal: FUNEP, p. 228-238, 1997.

EVANS, A. C., FLYNN, J. D., QUINN, K. M., DAFFY, P., QUINN, P., MADGWICK, S., CROSBY, T. F., BOLAND, M. P., BEARD, A. P., Ovulation of aged follicles does not affect embryo quality or fertility after a 14-day progestagen estrus synchronization protocol in ewes. **Theriogenology**, v.15, p. 923–936, 2001.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte size in relationship to follicular diameter, maturational competence and RNA synthesis. **Theriogenology**, New York, v. 43, p. 209, 1995.

FENESEY, P. F.; FISHER, M. W.; SHACKELL, G. H.; MACKINTOSH, C. G. Superovulation and embryo recovery in red deer (*Cervus elaphus*) hinds. **Theriogenology**, New York, v. 32, n. 5, p. 877-883, 1989.

FONTANA, C.S.; BENCKE, G.A.; REIS, R.E. **Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul**. EDIPUCRS, p. 632, 2003.

FRY, R.C.; NIALL, E. M.; SIMPSON, T. L.; SQUIRES, T. J.; REYNOLDS, J. The collection of oocytes from bovine ovaries. **Theriogenology**, v.47, p.977-987, 1997.

FUKUI, Y.; MCGOWAN, L.T.; JAMES, R.W.; ASHER, G.W.; TERVIT, H.R. Effects of culture duration and time of gonadotropin addition on in vitro maturation and fertilization in red deer (*Cervus elaphus*) oocytes. **Theriogenology**, New York, v. 35, p. 499-512, 1991.

GALL, L.; LE GAL, F.; DE SMEDT, V. Protein phosphorylation patterns during in vitro maturation of goat oocyte. **Mol Reprod Dev**, New York, v. 36, p. 500-506, 1993.

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

GIBBONS, A.; PEREYRA BONNET F.; CUETO M. A procedure for maximizing oocyte harvest for in vitro embryo production in small ruminants. **Reprod Dom Anim**, v.42, p. 423-426, 2007.

GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, New York, v. 67, n. 1, p. 6-15, 2007.

GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MONTGNER, M. M.; COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de Embriões *In: Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. (Eds.) Gonçalves, P. B. D.; Figueiredo, J. R. e Freitas, V. J. R.. São Paulo: Livraria Varela, p. 195-226, 2002.

GOODHAND, K. L.; STAINES, M. E.; HUTCHINSON, J. S. M.; BROADBENT, P. J. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine oocyte donors treated with progestagen, oestradiol and FSH. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 63, n. 3-4, p. 145-158, 2000.

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

HOLT, W.V.; PICKARD, A.R. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. **Rev. Reprod**. Cambridge v. 4, p. 143-150, 1999.

HOSOE M, SHIOYA Y. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. **Zygote**, New York, v. 5, p.371-376,1997.

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

HYTTEL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **J Reprod Fertil**, Cambridge, v. 38, p. 35-47, 1989.

HYTTEL, P.; XU, K. P.; SMITH, S.; GREVE, T. Ultrastructure of in vitro oocyte maturation in cattle. **J Reprod Fertil**, Cambridge v. 78, p. 615-25, 1986.

IUCN 2012. IUCN **Red List of Threatened Species**. Version 2012.2. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on **18 December 2012**.

JABBOUR, H. N.; HAYSSSEN, V.; BRUFORD, M. W. Conservation of deer: contributions from molecular biology, evolutionary ecology and reproductive physiology. **J Zoology**, v. 243, p. 461-484, 1997.

JAINUDEEN, M.R.; HAFEZ, E. S. E.; GOLLNICK, P.D.; MOUSTAFA, L.A. Antigonadotropins in the serum of cows following repeated therapeutic pregnant mare serum injections. **Am J Vet Res**, Schaumburg v. 27, p. 669-675, 1966.

JUNGIUS, H. Status and distribution of threatened deer species in South America. In: **World Wildlife Yearbook, 1975–1976**. World Wildlife Fund, Morges, p. 203–217, 1976.

KASTROP, P. M. M.; BEVERS, M. M.; DESTREE, O. H. J.; KRUIP, T. A. M. Analysis of protein synthesis in morphologically classified bovine follicular oocytes before and after maturation in vitro. **Mol Reprod Dev**, New York, v. 26, p. 222-226, 1990.

KIKUCHI, K.; IZAIKE, Y.; NOGUCHI, J.; FURUKAWA, T.; DAEN, F. P.; NAITO, K.; TOYODA Y. Decrease of histone H1 kinase activity in relation to parthenogenetic activation of pig follicular oocytes matured and aged *in vitro*. **J Reprod Fertil**, v. 105(2), p. 325-330, 1995.

KOEMAN, J.; KEEFER, C.L., BALDASSARRE, H.; DOWNEY, B.R. Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery. **Theriogenology**, v. 60, p.879-889, 2003.

KRISHER, R. L.; BAVISTER, B. D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, New York, v. 59, p. 103–114, 1998.

KROGENAES, A.; ROPSTAD, E.; THOMASSEN, R.; PEDERSON, O.; FORSBERG, M. In vitro maturation and fertilization from Norwegian semi-domestic reindeer (*Rangifer tarandus*). **Theriogenology**, New York, v. 41, p. 371-377, 1994.

KRUIP, T. A. M.; CRAN, D. G.; VAN BENEDEN T. H.; DIELEMAN, S. J. Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo. **Gamete Res**, New York, v. 8, p. 29–47, 1983.

LEDDA, S.; BOGLIOLO, L.; LEONI, G.; NAITANA, S. Production and lambing rate of blastocysts derived from in vitro matured oocytes after gonadotrofin treatment of prepuberal ewe. **J. Anim. Sci.**, v.77, p.2234-2239, 1999.

LEHMKUHL, R. C.; MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A. D.; BARBIERI, D. P.; MACHADO M. F.; RUBIN, M. I. B.; SILVA, C. A. M. Viabilidade de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular. **Ars veterinaria**, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 273-279, 2002.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. **J Anim Sci**, Champaign, v. 48, n. 1, p. 76-86, 1979.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. **J. Anim. Sci.**, Savoy, v.48(1), p.76-86, 1979.

LOCATELLI, Y.; VALLET, J. C.; HUYGHE, F. P.; COGNIÉ, Y.; LEGENDRE, X.; MERMILLOD, P. Laparoscopic ovum pick-up and in vitro production of sika deer embryos: Effect of season and culture conditions. **Theriogenology**, New York, v. 66, p. 1334–1342, 2006.

LONERGAN, P.; FAERGE, I.; HYTTEL, P. M.; BOLAND, M.; FAIR, T. Ultrastructural modifications in bovine oocytes maintained in meiotic arrest in vitro using roscovitine or butyrolactone. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 64, n. 3, p. 369–378, 2003.

LOSKUTOFF, N. M.; BARTELS, P.; MEINTJES, M.; GODKE, R. A.; SCHIEWE, M. C. Assisted reproductive technology in nondomestic ungulates: a model approach to preserving and managing genetic diversity. **Theriogenology**, New York, v. 43, p. 3-12, 1995.

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

MAPLETOFT, R. J.; STEWARD, K. B.; ADAMS G. P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reprod Nutr Dev**, Paris, v. 42, p. 601–611, 2002.

McCORKELL, R. B.; WOODBURY, M. R.; ADAMS, G. P. Induction of ovarian follicular wave emergence in wapiti (*Cervus elaphus*). **Theriogenology**, New York, v. 70, p. 1017–1023, 2008.

MIKICH, S. B.; BÉRNILS, R. S. Livro Vermelho da fauna ameaçada no Estado do Paraná. Instituto Ambiental do Paraná. p. 763, 2004.

MILOVANOV, C.; SIRARD, M. A. Manipulation of chromosome condensation by protein synthesis inhibitors and cyclic AMP during maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, New York, v. 41, p. 819-827, 1994.

MONFORT, S. L.; ASHER, G. W.; WILDT, D. E.; WOOD, T. C.; SCHIEWE, M. C.; WILLIAMSON, L. R.; BUSH, M.; RALL, W. F. Successful intrauterine insemination of Eld's deer (*Cervus eldi thamin*) with frozen –thawed spermatozoa. **J. of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 459-465, 1993.

MORROW, C. J.; ASHER, G. W.; BERG, D. K.; TERVIT, H. R.; PUGH, P. A.; MCMILLAN, W. H.; BEAUMONT, S.; HALL, D. R. H.; BELL, A. C. S. Embryo transfer in fallow deer (*Dama dama*): Superovulation, embryo recovery and laparoscopic transfer of fresh and cryopreserved embryos. **Theriogenology**, New York, v. 42, p. 579–590, 1994.

MORTON, K.M.; DE GRAAF, S.P.; CAMPBELL, A.; TOMKINS, L.M.; CHIS MAXWELL, W.M.; EVANS, G. Repeat ovum pick-up and in vitro embryo production from adult ewes with and without fsh treatment. **Reprod Dom Anim**, v. 40, p. 422–428, 2005.

MORTON, K. M.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Effect of aspiration pressure during oocyte harvesting on oocyte recovery and in vitro development of ovine oocytes. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 43, p. 106-110, 2008.

MULLER, E.; DUARTE, J. M. B. Utilização da citologia vaginal vaginal esfoliativa para monitoração de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*). In: **Congresso da sociedade de zoológicos do Brasil**, 16., Americana, SP. 1992.

NASSER, L.; ADAMS, G. P.; BO, G. A.; MAPLETOFT, R. J. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. **Theriogenology**, New York, v. 40, p. 713-724, 1993.

O'BRIEN, J. K.; CATT, S. L.; IRELAND, K. A.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. In vitro and in vivo developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep. **Theriogenology**, New York, v. 47, p. 1433-1443, 1997.

PAWSHE, C. H.; APPA RAO, K. B. C.; JAIN, S.K.; TOTEY, S.M. Biochemical studies on goat oocytes: timing of nuclear progression, effect of protein inhibitor and pattern of polypeptide synthesis during in vitro maturation. **Theriogenology**, New York, v. 42, p. 307–320, 1994.

PEREIRA, J. R. G.; POLEGATO, B. F.; SOUZA, S.; NEGRÃO, J. A.; DUARTE, J. M. B. Monitoring ovarian cycle and pregnancy in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) by measurement of fecal progesterone metabolites. **Theriogenology**, New York, v. 2, p. 387-399, 2006.

PIGON, H.; CLEGG, M. T.; COLE, H. H. The formation of antigonadotrophin in sheep and its effect on the endocrines and reproductive system **Acta Endocrinol**, Copenhagen, v. 35, p. 253–260, 1960.

PINDER, L.; LEEUWENBERG, F. Veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*, Fisher 1814). In: DUARTE, J. M. B. (Ed.). **Biologia e conservação de cervídeos Sul-Americanos: *Blastocerus*, *Ozotocerus* e *Mazama***. Jaboticabal: FUNEP, p.60-68, 1997.

POLEGATO, B. F.; DUARTE, J. M. B. Período de gestação e cio pós-parto em veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*). In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MASTOZOOLOGIA**, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Resumen...p. 286-287, 2003.

POLLARD, J. W.; BRINGANS, M. J.; BUCKRELL, B. In-vitro production of wapiti and red deer (*Cervus elaphus*) embryos. **Theriogenology**, New York, v. 43, p. 301, 1995.

PRINCE, C.; WEBB, R. Steroid control of gonadotropin secretion and ovarian function in heifers. **Endocrinol**, v. 122, p. 2222–2231, 1988.

PTAK, G.; CLINTON, M.; BARBONI, B.; MUZZEDDU M.; CAPPAL, P.; TISCHNER, M.; LOI, P. Preservation of the European mouflon: the first example of genetic management using a complete program of reproductive biotechnologies. **Biol Reprod**, Madison v. 66, p. 796-801, 2002.

PUTMAN, R. **The natural history of deer**. New York: Cornell University Press, 1988.

RENOU, P.; TROUNSON, A.O.; WOOD, C.; LEETON, J.F. The collection of human oocytes for in vitro fertilization. I. An instrument for maximizing oocyte recovery rate. **Fertil. Steril.**, Birmingham, v.35, n.4, p.409-412, 1981.

RODRÍGUEZ, C.; ALVAREZ, M.; BOIXO, J.; ANEL, E.; GUERRA, C.; OLMEDO, J.; DE PAZ, P.; ANEL, L. Variación de la respuesta ovárica en aspiraciones foliculares repetidas en corderas. **Libro de Ponencias y Comunicaciones de las XXV Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia**, p. 571-574. 2000.

RODRÍGUEZ, C.; ANEL, L.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J.; CHAMORRO, C.; DE PAZ, P. Ovum Pick-up in Sheep: a Comparison between Different Aspiration Devices for Optimal Oocyte Retrieval. **Reproduction in Domestic Animals**, Malden, v. 41, p. 106-113, 2006.

ROY, F.; MAUREL, M. C.; COMBES, B.; VAIMAN, D.; CRIBIU, E. P.; LANTIER, I.; POBEL, T.; DELETANG, F.; COMBARNOUS, Y.; GUILLOU F. The negative effect of repeated equine chorionic gonadotropin treatment on subsequent fertility in alpine goats is due to a humoral immune response involving the major histocompatibility complex **Biol Reprod**, Medison, v. 60, p. 805-813, 1999.

RUBIANES, E.; IBARRA, D.; UNGERFELD, R.; CARBAJAL, B.; CASTRO, T. Superovulatory response in anestrus ewes is affected by the presence of a large follicle. **Theriogenology**, New York, v. 43, p. 465-472, 1995.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. **Anim Reprod Sci**, Amsterdam, v. 78, p. 271-287, 2003.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A.; CARBAJAL, B. Response of the 1 to 5-day aged ovine corpus luteum to prostaglandin F<sub>2</sub>α. **Anim Reprod Sci**, Amsterdam, v. 78, p. 47-55, 2003.

RUBIANES, E.; UNGERFELD, R.; VIÑOLES, C.; RIVERO, A.; ADAMS, G. P. Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. **Theriogenology**, New York, v. 47, p. 1479-1488, 1997.

SADLEIR, R. M. F. S. Reproduction of female cervids. In: WEMMER, C. (Ed.). **Biology and management of the cervidae**. Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press, p.123-144, 1987.

SALVIANO, M. B. ; CURSINO, M. S. ; ZANETTI, E. S. ; CHRISTOFOLLETTI, M. D. ; DUARTE, J. M. B. Fertilização in vitro de oócitos de veado-mateiro (*Mazama americana*). In: XII Congresso XVIII Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, 2009, Águas de Lindóia. Anais do XVIII Encontro e XII Congresso da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens - ABRAVAS, 2009. p. 75-78.

SAMAKE, S.; AMOAH, E. A.; MOBINI, S.; GAZAL, O.; GELAYE, S.; In vitro fertilization of goat oocytes during the non-breeding season. **Small Rumin Res**, Amsterdam, v. 35, p. 49–54, 2000.

SAVIO, J. D.; THATCHER, W. W.; MORRIS, G. R.; ENTWISTLE, K.; DROST, M.; MATTIACCI, M. R. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. **J. Reprod. Fertil.**, v. 98, p. 77–84, 1993.

SENEDA, M. M.; BLASCHI, W. Ovum pick-up em bovinos: considerações técnicas. In: **Anais do 1º simpósio internacional de reprodução animal aplicada**, Londrina. Anais..., p. 231-237, 2004.

SHARMA, G.T.; MAJUMDAR, A.C.; BONDE, S.W. Chronology of maturational events in goat oocytes cultured in vitro. **Small Rumin Res**, Amsterdam, v. 22, p. 25–30, 1996.

SHORGAN, H.; PANG, Y.; Preliminary study on the in vitro fertilization of domestic camel (*Camelus bactrianus*). **Chin J Zool**, v. 28, p. 35–37 1993.

SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, New York, v. 55, n. 6, p.1241-1254, 2001.

SIRARD, M. A.; FLORMAN, H. M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; BARNES, F. L.; SIMS, M. L.; FIRST, N. L. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biol Reprod**, Medison, v. 40, p. 1257–1263, 1989.

SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, New York, v. 65, n. 1, p. 126-136, 2006.

SIRIAROONRAT, B. Development of in vitro fertilization for the endangered Eld's deer (*Cervus eldi thamin*): Effects of in vitro maturation, fertilization and culture on developmental competence. **Dissertation (Doctor of Philosophy)**, George Mason University, Fairfax, Virginia, United States of America, 2006.

SIRIAROONRAT, B.; COMIZZOLI, P.; SONGSASEN, N.; MONFORT, S. L.; WILDT, D. E.; PUKAZHENTHI, B. S. Oocyte quality and estradiol supplementation affect in vitro maturation success in the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Theriogenology**, New York, v. 73, n. 1, p. 112-119, 2010.

SIROTKIN, A. V. Involvement of steroid hormones in bovine oocytes maturation in vitro. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 41, 855–858, 1992.

SOUSA, P. A. de; MARTINS DA SILVA, S. J.; ANDERSON, R. A. Neurotrophin Signaling in Oocyte Survival and Developmental Competence: A Paradigm for Cellular Toti-Potency. **Cloning and Stem Cells**, New York, v. 6, n. 4, p. 375-385, 2004.

STANGL, M.; KTIHHOLZER, B.; BESENFELDER, U.; BREM G. Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. **Theriogenology**, Stoneham, v.52, p.709-716, 1999.

STOJKOVIC, M., MACHADO, S. A., SOTOJKOVIC, P., ZAKHARTCHENKO, V., HUTZLER, P., GONÇALVES, P. B., WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation, correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biol Reprod**, Medison, v. 64, p. 904–909, 2001.

SUN, Q. Y.; WU, G. M.; LAI, L.; PARK, K. W.; CABOT, R.; CHEONG, H. T.; DAY, B. N.; PRATHER, R. S.; SCHATTEN, H. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. **Reproduction**, Bristol, v. 122, p. 155–163, 2001.

SÜSS, U.; WÜTHRICH, K.; STRANZINGER, G. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes maturation in vitro. **Biol Reprod**, Medison, v. 38, p. 871-880, 1988.

TAKEDOMI, T.; AOYAGI, Y.; KONISHI, M.; KISHI, H.; TAYA, K.; WATANABE, G.; SASAMOTO, S. Superovulation of Holstein heifers by a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. **Theriogenology**, Stoneham, v. 43, p. 1259-1268, 1995.

TEIXEIRA, P.P.M. Aspiração Folicular Videolaparoscópica Em Ovinos: Avaliação Ovariana Macro E Microscópica. **Dissertação (Mestrado)**, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – UNESP. 2010

TERVIT, H. R.; SMITH, J. F.; MCGOWAN L. T.; PUGH, P. A. Birth of lambs from embryos produced in vitro following laparoscopic recovery of follicular oocytes. **Proc Aust Soc Reprod Biol**, v. 27, p. 68, 1995.

TERVIT, H.R. Laparoscopy / laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. **Anim Reprod Sci**, Amsterdam, v. 42, n. 1-4, p. 227-238, 1996.

THIBAUT C, D SZÖLLÖSI, M GÉRARD. Mammalian oocyte maturation. **Reprod Nutr Dev**, Paris, v. 27, p.865–96, 1987.

TIBARY, A.; ANOUASSI, A.A.; KHATIR, H. Update on reproductive biotechnologies in small ruminants and camelids. **Theriogenology**, New York, v. 64, p. 618-638, 2005.

VELILLA, E.; IZQUIERDO, D.; RODRIGUEZ-GONZALEZ, E.; LOPEZ-BEJAR, M.; VIDAL, F.; PARAMIO, M.T. Distribution of prepubertal and adult goat oocyte cortical granules during meiotic maturation and fertilization, ultrastructural and cytochemical study. **Mol Reprod Dev**, New York, v. 68, p. 507–514, 2004.

VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A.; FERREIRA, A. M.; AS, W. F. de; 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. **Anim Reprod Sci**, Amsterdam, v. 84, p. 1–12, 2004.

VIGNOLA, A. H.; PRADO, A.; VALENTE, A. et al. Técnicas de coloração cromossômica para estádios específicos da maturação nuclear de oócitos bovinos. **Ciên. Rural**, v.24, p.583-589, 1994.

VIÑALES, C.; FORSBERG, M.; BANCHERO, G.; RUBIANES, E. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on estrus response, conception rate and follicular development in cycling ewes. **Theriogenology**, v. 55, p. 993–1004, 2001.

WALDHALM, S. J.; JACOBSON, H. A.; DHUNGEL, S. K. e BEARDEN, H. J. Embryo transfer in the white-tailed deer: a reproductive model for endangered deer species of the world. **Theriogenology**, New York, v. 31, n. 2, p. 437-449, 1989.

WARRIACH, H. M.; CHOCHAN, K. R. Thickness of cumulus cell layer is a significant factor in meiotic competence of buffalo oocytes. **J Vet Sci**, v. 5, p. 247–51, 2004.

WENKOFF, M. S.; BRINGANS., M. J. Embryo transfer in cervids. In: RENECKER, L. A.; HUDSON, R.J. (Eds.). **Wildlife production – conservation and sustainable development**. University of Alaska: Fairbanks, p. 461-463, 1991.

WESSEL, G. M.; BROOKS, J. M.; GREEN, E.; HALEY, S.; VORONINA, E.; WONG, J.; ZAYDFUDIM, V.; CONNER, S. The biology of cortical granules. **International Review of Cytology**, v. 209, p. 117-206, 2001.

WHITEHEAD, G. K. **The Whitehead Encyclopedia of Deer**. London: Swan Hill Press, 1993.

WILDING, M.; DALE, B.; MARINO, M.; DI MATTEO, L.; ALVIGGI, C.; PISATURO, M.L.; LOMBARDI, L.; DE PLÁCIDO, G. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. **Hum Reprod**, Oxford, v. 16, p. 909–917, 2001.

WU, B.; IGNOTZ, G.G.; CURRIE, W.B.; YANG, X. Temporal distinctions in the synthesis and accumulation of proteins by oocytes and cumulus cells during maturation in vitro of bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 45, p. 560–565, 1996.

XU, K. P.; BRACKETT, B. G. A detailed analysis of early events during in vitro maturation, fertilization of bovine follicular oocyte. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 82, p. 127-134, 1988.

YADAV, B. R.; KATIYAR, P.K.; CHAUHAN, M.S.; MADAN, M.L. Chromosome configuration during in vitro maturation of goat, sheep and buffalo oocytes. **Theriogenology**, New York, v. 47, p. 943–951, 1997.

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 (2), p. 471-482, 1998

YOUNIS, A. I.; BRACKETT, B. G.; FAYRER-HOSKEN, R.A. Influence of serum and hormones on bovine oocytes maturation and fertilization in vitro. **Gamete Res**, v. 23, p.189–201, 1989.

ZANETTI, E. S. Protocolos de superovulação em Veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*). 87p. **Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)**, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, São Paulo, Jaboticabal, 2009.

ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B. Comparison of three protocols for superovulation of brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). **Zoo Biology**, New York, v. 31, n. 6, p. 642-655, 2012.

ZHANG, L.; JIANG, S.; WOZNIAK, P. J.; YANG, X.; GODKE, R. A. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. **Molec Reprod Dev**, New York, v. 40, p. 338-344, 1995.