

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

**EFEITOS DA SUBSTITUIÇÃO DO SORO FETAL BOVINO (SFB)
E DA ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA) PELA OVALBUMINA
(OVA) NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Tatiane Almeida Drummond Tetzner

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia

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

Jaboticabal – São Paulo – Brasil

Fevereiro de 2007

Tetzner, Tatiane Almeida Drummond
T349e Efeitos da substituição do soro fetal bovino (SFB) e da albumina sérica bovina (BSA) pela ovalbumina (OVA) na produção *in vitro* de embriões bovinos / Tatiane Almeida Drummond Tetzner. – – Jaboticabal, 2007
xxi, 92 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007

Orientador: Joaquim Mansano Garcia

Banca examinadora: César Roberto Esper, Simone Cristina Méo

Niciura

Bibliografia

1. Produção *in vitro*. 2. Bovino. 3. Fontes protéicas. 4. Ovalbumina. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.646:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
– Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: tatiane_tetzner@yahoo.com.br

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

TATIANE ALMEIDA DRUMMOND TETZNER – nascida em Ituiutaba – MG, aos 07 dias do mês de outubro de 1980; concluiu o ensino médio no “Colégio Carlos Drummond de Andrade – Nacional”, na cidade de Uberlândia – MG, em dezembro de 1998. Ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Medicina Veterinária – FAMEV, Universidade Federal de Uberlândia – UFU, em agosto de 1999; obteve bolsa de Iniciação Científica pelo CNPq. Concluiu, em julho de 2004, o curso superior em Medicina Veterinária. Obteve bolsa de Treinamento Técnico pela FAPESP, junto ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Universidade Estadual Paulista - UNESP – Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, de agosto de 2004 a fevereiro de 2005. Ingressou, em março de 2005, no curso de Pós-graduação, ao nível de Mestrado, sob a orientação do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, no Programa de Medicina Veterinária, Área de concentração em Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV, Campus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista – UNESP, com bolsa de Mestrado pela FAPESP e pela CAPES. Aprovada em Exame de Seleção em setembro de 2006, no curso de Pós-graduação, ao nível de Doutorado; iniciará as atividades em março de 2007, no Programa de Medicina Veterinária, Área de concentração em Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV, Campus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista – UNESP.

Memória

*Amar o perdido
deixa confundido
este coração.*

*Nada pode o olvido
contra o sem sentido
apelo do Não.*

*As coisas tangíveis
tornam-se insensíveis
à palma da mão.*

*Mas as coisas findas
muito mais que lindas,
essas ficarão.*

Carlos Drummond de Andrade

Dedico aos meus pais,
João Henrique Tetzner e Thelma Regina Almeida Drummond Tetzner,
por me ensinarem que acima de tudo o que vale na vida é o que “somos”,
e por serem exemplos para mim.

Dedico aos meus avós,
Vô Rui e Vó Vera, pela presença contínua e pelo incentivo
incondicional em todas as fases da minha vida,
Vô Lotário e Vó Ilda, exemplos de simplicidade e trabalho.

Dedico aos meus bisavós falecidos,
Arlindo e Júlia, João e Santina, e Zelândia, foram poucos os
momentos juntos vividos, mas eternas são as lembranças.

Dedico a toda minha família, em especial ao **Tio Arlindo**,
que sempre se fez presente e incentivou cada passo,
e a minha irmã **Talita**, que tanto amo.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** que se faz sempre presente em minha vida, fonte de luz, renovação e amparo, e que a cada dia me surpreende por sua generosidade para comigo.

Ao professor **Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia** pela orientação, pelos ensinamentos, e por ser exemplo de sucesso, perseverança, e por ter me acolhido desde a época do estágio.

À **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP**, e à **Pós-graduação** pela oportunidade oferecida e por proporcionar a realização do Mestrado.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da Bolsa de Estudos e pelo investimento financeiro neste trabalho.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal – UNESP Jaboticabal, em especial ao **Prof. Dr. César Roberto Esper**, e ao **Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente**, pelos ensinamentos transmitidos, pelos conselhos e apoio durante todo esse período.

Ao professor **Dr. João Martins Pizauro Júnior**, pela contribuição durante a fase inicial do experimento, e pelos ensinamentos em bioquímica, e ao professor **Dr. Euclides Braga Malheiros**, pela contribuição durante a fase final do trabalho, e pelos ensinamentos em estatística.

Aos professores da FAMEV - Universidade Federal de Uberlândia - UFU, em especial ao **Prof. Dr. Edmundo Benedetti**, pela orientação durante a iniciação científica e pela amizade, **Prof. Dr. Elmo Gomes Diniz**, pelo auxílio e incentivo em “trilhar” os caminhos da Reprodução Animal, **Prof. Dr. Adriano Pirtousheg** e **Profa. Dra. Mara Regina Bueno Nascimento**, pelo incentivo desde a graduação, pelos conselhos e ensinamentos.

Aos funcionários e amigos do DRA, **Isabel Aparecida Penariol Natarelli**, **Ivo Luiz de Almeida Jr.** e **Paulo Sérgio da Silva**, pela convivência e por todos os auxílios. Em especial meu agradecimento a **Rô**, **Roberta Vantini**, pela amizade, dedicação, companheirismo, e ajuda fundamental durante todo o experimento.

Aos amigos do laboratório que não estão mais presentes: **Andréa Cristina Basso**, **Alexandre Wolf**, **Eliana Gazoto**, **Eric Castro**, **Gabriel Soria**, **Karina Beloti Avelino**, **Lorivaldo Paz Landim Jr**, **Viviane Sgobbi Dias** e **Walt Yamazaki**, e aos presentes que contribuíram com esse trabalho: **Aline Costa de Lúcio**, **Ana Paula Perini**, **Clara Slade**, **Fábio Morato**, **Danilas Salinet de Melo**, **Juliana Corrêa Borges**, **Letícia de Sá Barreto**, **Mabel Freitas Cordeiro**, **Maria Emília**, **Max Vitória Resende**, **Roberta** e **Rúbia Bueno Silva**, agradeço a todos pela convivência, auxílio e companheirismo.

Às amigas muito especiais, **Christina Ramires Ferreira**, **Naiara Zoccal Saraiva** e **Simone Cristina Méo Niciura**, pela força, incentivo, amizade, auxílio, sugestões, e por todos os ensinamentos, vocês foram essenciais nessa fase; e ao amigo **Felipe Perecin**, pelas contribuições em estatística, pelo companheirismo e amizade.

A toda minha **família**, pela constante preocupação, pelo amor e carinho, e por compreenderem a minha ausência, sempre apoiando e incentivando a continuar a “caminhada”...

Às amigas **Carlitcha, Dani, Déia, Naná e Rá**, companheiras fiéis, pessoas importantes e presentes na minha vida em Jaboticabal, agradeço pelas risadas, pelas lágrimas, pelos inúmeros favores, enfim, por tudo que vivemos juntas.

Aos **estagiários** que auxiliaram nas etapas práticas no Laboratório, e que muito contribuem nos experimentos executados, agradeço pelo auxílio e convívio.

Enfim, a **todos**, que de forma direta ou indireta, participaram na realização deste trabalho e contribuíram de alguma forma para conclusão de mais essa etapa, meus sinceros agradecimentos.

APOIO FINANCEIRO

Esse projeto foi financiado pela **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, sob processo nº 04/12248-8, no período de março de 2005 a julho de 2006, e pela **CAPES**, no período de setembro de 2006 a fevereiro de 2007.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|-----------|
| LISTA DE TABELAS..... | xii |
| LISTA DE FIGURAS..... | xv |
| ABREVIATURAS..... | xix |
| RESUMO..... | xxi |
| ABSTRACT..... | xxii |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 4 |
| 2.1. Soro Fetal Bovino (SFB) como fonte de suplementação protéica na produção <i>in vitro</i> de embriões..... | 4 |
| 2.2. Histórico da Albumina – Fração Cohn / Fração V..... | 6 |
| 2.3. Albumina Sérica Bovina (BSA) como fonte de suplementação protéica na produção <i>in vitro</i> de embriões..... | 7 |
| 2.4. Macromoléculas quimicamente definidas utilizadas na produção <i>in vitro</i> de embriões..... | 9 |
| 2.5. Definição, classificação e propriedades das proteínas..... | 11 |
| 2.6. Ovalbumina (OVA)..... | 11 |
| 2.7. Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos..... | 13 |
| 2.7.1. Maturação <i>in vitro</i> | 13 |
| 2.7.2. Fecundação <i>in vitro</i> | 16 |
| 2.7.3. Desenvolvimento e viabilidade embrionária..... | 17 |
| 3. OBJETIVOS..... | 19 |
| 3.1. Objetivos gerais..... | 19 |
| 3.2. Objetivos específicos..... | 19 |
| 4. HIPÓTESE..... | 20 |
| 5. MATERIAL E MÉTODOS..... | 20 |

| | |
|--|-----------|
| 5.1. Experimento I: Influência da concentração de ovalbumina na maturação nuclear e na migração de grânulos corticais em oócitos bovinos..... | 20 |
| 5.1.1. Obtenção, seleção e maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos..... | 21 |
| 5.1.2. Avaliação da maturação oocitária..... | 23 |
| 5.2. Experimento II: Avaliação da influência da ovalbumina como suplemento protéico na maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos..... | 25 |
| 5.2.1. Obtenção, seleção e maturação <i>in vitro</i> dos oócitos bovinos..... | 26 |
| 5.2.2. Avaliação da maturação oocitária..... | 26 |
| 5.3. Experimento III: Avaliação da influência da ovalbumina como suplemento protéico na fecundação <i>in vitro</i>..... | 27 |
| 5.3.1. Obtenção, seleção e maturação <i>in vitro</i> dos oócitos bovinos..... | 27 |
| 5.3.2. Fecundação <i>in vitro</i> (FIV) dos oócitos bovinos..... | 27 |
| 5.3.3. Avaliação da formação de pronúcleos..... | 29 |
| 5.4. Experimento IV: Avaliação dos efeitos da ovalbumina nas etapas de maturação, fecundação e cultivo <i>in vitro</i> e sua conseqüência no desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>..... | 29 |
| 5.4.1. Obtenção, seleção e maturação <i>in vitro</i> dos oócitos bovinos..... | 30 |
| 5.4.2. Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)..... | 30 |
| 5.4.3. Cultivo <i>in vitro</i> (CIV) dos prováveis zigotos..... | 30 |
| 5.4.4. Quantificação das taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário e de eclosão dos embriões CIV..... | 33 |
| 5.4.5. Verificação da qualidade embrionária através do número de células da MCI, do TF, e total nos embriões CIV..... | 33 |
| 5.5. Análise Estatística..... | 35 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 36 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 69 |
| 8. IMPLICAÇÕES..... | 70 |
| 9. REFERÊNCIAS..... | 71 |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|---|--------|
| Tabela 1. Apresentação esquemática dos tratamentos utilizados na etapa de maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos (Experimento I)..... | 22 |
| Tabela 2. Apresentação esquemática dos tratamentos utilizados na etapa de maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos (Experimento II)..... | 26 |
| Tabela 3. Apresentação esquemática dos tratamentos utilizados nas etapas de maturação e fecundação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos (Experimento III)..... | 29 |
| Tabela 4. Apresentação esquemática dos tratamentos utilizados nas etapas de maturação, fecundação e cultivo <i>in vitro</i> (Experimento IV)..... | 31 |
| Tabela 5. Valores médios (% \pm dp) de maturação nuclear (oócitos em metáfase II) após cultivo de maturação por 24h, em meios suplementados com 10% SFB (CONT), ou diferentes concentrações de ovalbumina, 2 (OVA 2), 4 (OVA 4) ou 6mg/mL (OVA 6)..... | 37 |
| Tabela 6. Valores médios (% \pm dp) de oócitos bovinos apresentando GC periféricos, como indício de maturação citoplasmática, após cultivo de maturação por 24h, em meios suplementados com 10% SFB (CONT), ou diferentes concentrações de OVA: 2 (OVA 2), 4 (OVA 4) ou 6mg/mL (OVA6)..... | 39 |

| | |
|--|----|
| Tabela 7. Valores médios (% \pm dp) de maturação nuclear (oócitos em metáfase II) após cultivo de maturação por 24h, em meios suplementados com 10% SFB (SFB), ou 4mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), ou 4mg/mL de ovalbumina (OVA), ou 2mg/mL BSA + 2mg/mL OVA (BO)..... | 42 |
| Tabela 8. Valores médios (% \pm dp) de oócitos bovinos apresentando GC periféricos, como indício de maturação citoplasmática, após cultivo de maturação por 24h, em meios suplementados com 10% SFB (SFB), ou 4mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), ou 4mg/mL de ovalbumina (OVA), ou 2mg/mL BSA + 2mg/mL OVA (BO)..... | 44 |
| Tabela 9. Valores médios (número total e %) da formação de pronúcleos com 18 a 20 h após início da fecundação, em seis tratamentos: controle (CONT), SFB e OVA (SO), BSA e BSA (BB), BSA e OVA (BO), OVA e BSA (OB), e OVA e OVA (OO)..... | 47 |
| Tabela 10. Valores do qui-quadrado nas comparações entre grupo controle (CONT) com todos os demais tratamentos: SFB e OVA (SO), BSA e BSA (BB), BSA e OVA (BO), OVA e BSA (OB), e OVA e OVA (OO)..... | 47 |
| Tabela 11. Valores médios (% \pm dp) da taxa de clivagem após maturação, fecundação e início de desenvolvimento em meios suplementados com SFB ou BSA ou OVA..... | 52 |
| Tabela 12. Valores médios (% \pm dp) da taxa de produção de blastocistos após maturação, fecundação e cultivo de desenvolvimento em meios suplementados com SFB ou BSA ou OVA..... | 53 |

Tabela 13. Valores médios ($\% \pm dp$) da taxa de eclosão de blastocistos após maturação, fecundação e cultivo de desenvolvimento em meios suplementados com SFB ou BSA ou OVA..... 54

Tabela 14. Valores médios $\pm (dp)$ do número de células na MCI, TF e Totais nos embriões bovinos em D7, produzidos em meios suplementados com SFB, ou BSA, ou OVA durante as etapas de MIV, FIV e CIV, respectivamente..... 63

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Aspecto morfológico dos COCs e oócitos bovinos selecionados para a maturação *in vitro*. (a) e (a₁) Oócitos antes da MIV. (b) e (b₁) Oócitos com expansão das células do *cumulus*, após 24 h de maturação *in vitro*..... 23
- Figura 2.** Aspecto morfológico de oócitos bovinos após a remoção das células do *cumulus* e durante a etapa de remoção da zona pelúcida (ZP). (a) e (a₁) Oócitos com ausência das células do *cumulus* e com a presença da ZP (Seta). (b) e (b₁) Oócitos com ZP removidas (Seta)..... 24
- Figura 3.** Aspecto morfológico dos COCs, oócitos e prováveis zigotos. (a) Oócitos com expansão das células do *cumulus*, após 24 h de MIV. (b) Prováveis zigotos após 18 a 20 h de FIV..... 28
- Figura 4 .** A PIV foi realizada mediante maturação (MIV) durante 24 horas, fecundação (FIV) e cultivo (CIV) de 18 a 20 horas após a inseminação (hpi). Decorridas 32 a 36 horas pós-inseminação (hpi) foi realizada a contagem da taxa de clivagem, no D7 foi verificada a taxa de produção de blastocistos e no D8 e no D9, avaliada a taxa de eclosão, com intuito de avaliar o efeito das diferentes fontes protéicas nas três etapas da PIV..... 32
- Figura 5.** Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de oócitos em metáfase II, após 24h de maturação *in vitro*, em meios suplementados com 10% SFB, ou 2, ou 4 ou 6mg/mL de OVA..... 37

- Figura 6.** Aspecto morfológico da progressão nuclear em oócitos bovinos MIV por 24h, corados com Hoechst 33342 e avaliados sob microscopia de epifluorescência. (a) Oócito não maturo (VG); (b) Oócito maturo, apresentando metáfase II (M), com presença do primeiro corpúsculo polar (1CP)..... 38
- Figura 7.** Aspecto morfológico da distribuição dos grânulos corticais em oócitos bovinos MIV por 24h, corados com lecitina (específica a α -D-manose) conjugada a FITC, e avaliados sob microscopia de epifluorescência. (a) Oócito apresentando GC dispostos em “clusters” no citoplasma (oócito imaturo); (b) Oócito apresentando GC dispostos em todo o citoplasma, no centro e na periferia (oócito em transição imaturo/maturo); (c) Oócito apresentando GC dispostos na periferia (oócito maturo)..... 38
- Figura 8.** Representação gráfica da porcentagem média e do desvio padrão de oócitos com grânulos corticais na periferia, como indicio de maturação citoplasmática, após 24h de maturação *in vitro*, em meios suplementados com 10% SFB, ou 2, ou 4 ou 6mg/mL de OVA..... 40
- Figura 9.** Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de oócitos em metáfase II, após 24h de maturação *in vitro*, em meios suplementados com 10% SFB, ou 4mg/mL de BSA, ou 4mg/mL de OVA, ou 2mg/mL de BSA + 2mg/mL de OVA (BO)..... 43
- Figura 10.** Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de oócitos com grânulos corticais na periferia, como indicio de maturação citoplasmática, após 24h de maturação *in vitro*, em meios suplementados com 10% SFB, ou 4mg/mL de BSA, ou 4mg/mL de OVA, ou 2mg/mL de BSA + 2mg/mL de OVA (BO)..... 44

- Figura 11.** Representação gráfica da porcentagem média de zigotos segundo o estágio pronuclear após 18 a 20 horas do início da fecundação *in vitro* (FIV), em meio TALP-FIV suplementado com BSA ou OVA..... 48
- Figura 12.** Aspecto morfológico do estágio pronuclear em zigotos coletados após 18 a 20 horas do início da fecundação *in vitro* (FIV). (a) Zigoto com 2 pronúcleos (PN); (b) zigoto com 1 PN. DNA corado com 10µg/mL de Hoechst 33342 por 20 min..... 48
- Figura 13.** Representação gráfica da quantificação das taxas de clivagem sob diferentes suplementos protéicos nas etapas de MIV, FIV e CIV..... 52
- Figura 14.** Representação gráfica da quantificação das taxas de produção de blastocistos sob diferentes suplementos protéicos nas etapas de MIV, FIV e CIV..... 53
- Figura 15.** Representação gráfica da quantificação das taxas de eclosão dos blastocistos, sob diferentes suplementos protéicos nas etapas de MIV, FIV e CIV..... 54
- Figura 16.** Aspecto morfológico de embriões bovinos. (a) Embriões clivados nos estádios de 4 a 8 células. (a₁) Embrião de 8 células. (b) e (b₁) Blastocistos em D7 e BIs expandidos (Setas). (c) Blastocistos eclodidos (Be) e presença das zonas pelúcidas (ZP) próximas, em D8 e D9. (c₁) Blastocisto em eclosão (Seta)..... 56
- Figura 17.** Representação gráfica da média do número de células da massa celular interna (MCI), nos blastocistos, sob diferentes suplementos protéicos nas etapas de MIV, FIV e CIV de produção *in vitro* de embriões bovinos..... 63

- Figura 18.** Representação gráfica da média do número de células do trofoblasto (TF), nos blastocistos, sob diferentes suplementos protéicos nas etapas de MIV, FIV e CIV de produção *in vitro* de embriões bovinos..... 64
- Figura 19.** Representação gráfica da média do número de células totais, nos blastocistos, sob diferentes suplementos protéicos nas etapas de MIV, FIV e CIV de produção *in vitro* de embriões bovinos..... 64
- Figura 20.** Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de células da MCI e do TF, em relação ao número total de células dos blastocistos produzidos sob diferentes suplementos protéicos nas etapas de MIV, FIV e CIV..... 65
- Figura 21.** Fotomicrografias de blastocistos (sete dias após a FIV) avaliados pela técnica de coloração diferencial sob microscopia de epifluorescência. Azul (Hoechst 33342): núcleo das células da massa celular interna; Rosa (iodeto de propídeo + Hoechst): núcleo das células do trofoblasto..... 66

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---------------------------------------|
| ANOVA | Análise de Variância |
| BI | Blastocisto |
| BIs | Blastocistos |
| BSA | Albumina sérica bovina |
| °C | Grau Celsius |
| céls. | Células |
| CIV | Cultivo embrionário <i>in vitro</i> |
| CO ₂ | Dióxido de Carbono |
| COC | Complexo <i>cumulus</i> -oócito |
| CP | Corpúsculo polar |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| DP | Desvio padrão |
| FAF | “Fatty acids free” |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína |
| FIV | Fecundação <i>in vitro</i> |
| FSH | Hormônio folículo estimulante |
| G | Gauge |
| GC | Grânulos corticais |
| GVBD | Ruptura da vesícula germinativa |
| h | Horas |
| hCG | Gonadotrofina coriônica humana |
| hpi | Horas pós-inseminação |
| HSA | Albumina sérica humana |
| LH | Hormônio luteinizante |
| LOS | “Large offspring syndrome” |
| MCI | Massa celular interna |
| MII | Metáfase II |
| mg | Miligramas |
| min | Minutos |
| MIV | Maturação <i>in vitro</i> |
| MLI | Meio de lavagem e incubação |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| mM | Milimolar |
| MPF | Fator promotor de maturação |
| nm | Nanômetro |
| N ₂ | Nitrogênio |
| OPU | Punção folicular guiada por ultra-som |
| OVA | Ovalbumina |
| O ₂ | Oxigênio |

| | |
|----------|---|
| PBS | Tampão salina fosfato |
| PHE | Penicilamina, hipotaurina e epinefrina |
| PIV | Produção <i>in vitro</i> |
| PN | Pronúcleo |
| PVA | Álcool polivinílico |
| PVP | Polivinil pirrolidona |
| SAS | “Statistical analysis system” |
| SB | Solução de bloqueio |
| SFB | Soro fetal bovino |
| SOF | Fluido sintético de oviduto |
| T | Número total de células |
| TALP | “Tyrode’s Albumin Lactate and Pyruvate” |
| TCM-199 | “Tissue culture medium 199” |
| TF | Trofoblasto |
| VG | Vesícula germinativa |
| Zig | Zigoto |
| ZP | Zona pelúcida |
| µg | Micrograma |
| µL | Microlitro |
| µM | Micromolar |
| % | Porcentagem |
| χ^2 | Qui-quadrado |

EFEITOS DA SUBSTITUIÇÃO DO SORO FETAL BOVINO (SFB) E DA ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA) PELA OVALBUMINA (OVA) NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

RESUMO – O presente trabalho objetivou avaliar os efeitos da substituição do SFB e do BSA pela OVA na PIV, por estudos nas etapas de maturação, fecundação e cultivo *in vitro*. Observamos que durante a etapa de maturação, a concentração 4mg/mL de OVA não afetou a maturação nuclear (82,66%) e a migração de grânulos corticais (GC) para a periferia dos oócitos (54,21%), sendo, portanto, utilizada nos experimentos subseqüentes. Foi observado que as fontes protéicas SFB, BSA, OVA, e BSA com OVA (BO) não afetaram ($p>0,05$) as taxas de maturação nuclear e migração de GC. Para a sigla dos tratamentos, as fontes protéicas foram identificadas pelas iniciais (SFB=S, BSA=B e OVA=O). Cada tratamento foi abreviado com a primeira letra referente à etapa de maturação, a segunda à fecundação, e a terceira ao cultivo. Quanto às taxas de formação de pronúcleo (PN) observamos que o grupo SO (76,67% de 2 PN) foi semelhante ($p>0,05$) ao grupo controle (82,95% de 2 PN). A etapa de CIV permitiu avaliar que os diferentes tratamentos foram semelhantes ($p>0,05$) quanto à taxa de clivagem. Entretanto, quanto à taxa de produção de blastocistos, o grupo OOO (26,0%) foi semelhante ($p>0,05$) aos grupos SOS (33,8%), BBB (35,8%), BOB (32%), e OBO (33%), mas foi inferior ($p<0,05$) aos grupos CONT (45%) e SBS (42,8%). Quanto à taxa de eclosão, o grupo OOO (20,4%), foi inferior ($p<0,05$) aos grupos CONT (46,2%), SBS (43,4%), SOS (38,4%), BBB (41,6%), e semelhante aos grupos BOB (28,2%) e OBO (25,4%). Concluimos que é possível produzir embriões bovinos na ausência de SFB e/ou BSA, com a fonte protéica OVA, embora tanto a quantidade como a qualidade dos blastocistos tenham se apresentado inferiores em relação àqueles produzidos na presença de SFB e/ou BSA.

Palavras-chave: produção *in vitro*, bovino, fontes protéicas, ovalbumina.

**EFFECTS OF FETAL BOVINE SERUM (FBS) AND BOVINE SERUM
ALBUMIN (BSA) SUBSTITUTION FOR OVALBUMIN (OVA) ON *IN VITRO*
PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS**

ABSTRACT - The present work aimed to evaluate the effects of FCS and BSA substitution for OVA on *in vitro* production of bovine embryos, studying *in vitro* maturation, fertilization, and development. For maturation, we observed that the concentration 4mg/mL of OVA didn't affect nuclear maturation (82.66%), and cortical granule (CG) migration (54.21%), which indicated its use in the subsequent experiments. It was observed that the protein sources FBS, BSA, OVA and BO didn't significantly affect ($p>0.05$) the rates of nuclear maturation and CG migration. For evaluation of pronucleus (PN) formation rates, we observed that the SO group (the first letter means the protein source for the maturation stage, the second for the fertilization, and the third for the development), (76.67% of 2 PN) was similar ($p>0.05$) to the control group (82.95% of 2 PN). However, two pronucleus formation rates in BB (56.98%), BO (39.02%), OB (37.36%) and OO (39.24%) were different ($p<0.05$) from the control group (82.95% of 2 PN). Different treatments (CONT, SBS, SOS, BBB, BOB, OOO, OBO) were similar ($p>0.05$) in cleavage rates. However, regarding to blastocyst production rates, the OOO group (26.0%) was similar ($p>0.05$) to the SOS group (33.8%), BBB (35.8%), BOB (32%), and OBO (33%) groups, but it was inferior ($p <0.05$) compared to the CONT (45%) and SBS (42.8%) groups. In relation to blastocyst hatching rate, the OOO group (20.4%) was inferior ($p<0.05$) when compared to the CONT (46.2%), SBS (43.4%), SOS (38.4%), BBB (41.6%) groups, and it was to BOB (28.2%) and OBO (25.4%) groups. We concluded that it's possible to produce bovine embryos in the absence of FBS and/or BSA using ovalbumin (OVA) as the protein source, even though decreased quantity and quality rates of bovine blastocysts were observed.

Keywords: *in vitro* production, bovine, protein sources, ovalbumin.

1. INTRODUÇÃO

As biotecnologias aplicadas à reprodução animal vêm causando grandes impactos à produção animal, principalmente nas últimas duas décadas. No entanto, até mesmo as biotécnicas mais complexas como a clonagem e a transgenia são dependentes da técnica básica de produção *in vitro* (PIV) de embriões.

A PIV de embriões bovinos é uma ferramenta muito importante para o melhoramento genético animal, desde que utilizada com critério. Sendo assim, os avanços na bovinocultura podem ser acelerados com o uso dessa biotecnologia, com a finalidade de maior exploração reprodutiva de animais geneticamente superiores. Portanto, estudos na área de PIV são necessários para otimizar os resultados, pois as pesquisas em todas as etapas, como maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) de embriões bovinos, são extremamente importantes para a própria evolução da biotécnica, bem como para fornecer suporte às outras biotecnologias mais complexas e sofisticadas.

Em mamíferos, a fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial *in vivo* ocorrem nas tubas uterinas, e a principal razão de se estudar e investigar o fluido presente no oviduto é para se obter sucesso nas técnicas de transferência de embriões (TE) e fecundação *in vitro* (FIV) (LEESE et al., 2001).

Historicamente, o meio de cultivo para o desenvolvimento de embriões de mamíferos contém soro fetal bovino (SFB) ou albumina como suplemento, na forma de albumina sérica bovina (BSA) ou albumina sérica humana (HSA) (BAVISTER et al., 1992; GARDNER e LANE, 1993). Assim, SFB e BSA são as fontes protéicas mais comumente utilizadas como suplemento do meio de cultura para a produção *in vitro* de embriões bovinos (MINGOTI, 2000).

As barreiras sanitárias para comercialização de embriões bovinos produzidos *in vitro* são decorrentes da falta de controle dos produtos de origem animal que são utilizados como fontes de suplementação protéica durante o processo de PIV (BAVISTER et al., 1992).

SFB e BSA são complexas misturas não definidas de diferentes proteínas, possivelmente contendo vários pequenos peptídeos, substratos energéticos e fatores de crescimento que participam no desenvolvimento embrionário (KANE e HEADON, 1980; MENEZO et al., 1982; KANE, 1985). Dessa maneira, SFB e BSA são conhecidos por promoverem o crescimento de embriões cultivados *in vitro* (LEESE, 1988; PRATTEN et al., 1988).

Por outro lado, a albumina sérica bovina e o soro fetal bovino são preparados e purificados a partir de produtos derivados sangüíneos e, conseqüentemente, apresentam altos riscos de contaminação por patógenos, como alguns vírus: vírus do herpes bovino 1 (BHV-1), e o vírus da diarreia bovina a vírus (BVDV) (GUERIN et al., 1988), e príons, como o da encefalopatia espongiforme bovina (BSE) (BATT et al., 1991; KRISHER et al., 1999). Além disso, assim como o co-cultivo, essas fontes protéicas podem introduzir componentes tóxicos ao meio (KRISHER e BAVISTER, 1999).

Alternativas à utilização de SFB e BSA têm sido buscadas por meio da utilização de macromoléculas sintéticas, como o álcool polivinílico (PVA) e a polivinil pirrolidona (PVP), visando à obtenção de meios de cultura definidos. Entretanto, os resultados obtidos são muito controversos com relação à quantidade e à qualidade de embriões produzidos *in vitro*. A utilização de PVA em substituição à albumina e ao soro fetal no meio de cultivo embrionário promoveu redução nas taxas de desenvolvimento quando comparada aos sistemas suplementados com SFB e BSA (TAKAHASHI e FIRST, 1992; KESKINTEPE e BRACKETT, 1996; ECKERT et al., 1998; KRISHER et al., 1999; WRENZYCKI et al., 1999), demonstrando que o desenvolvimento embrionário necessita de fatores encontrados no SFB ou no BSA para diferenciação e proliferação celular (LIM et al., 1999a). Além disso, análises dos blastocistos cultivados com PVA revelaram taxas reduzidas de metabolismo (ECKERT et al., 1998) e conteúdo protéico (THOMPSON et al., 1998) comparado ao cultivo contendo albumina. Além do que, o PVA não é capaz de sustentar a reação acrossomal e a fecundação, em várias espécies (BAVISTER et al., 1992). Dessa

maneira, Soria (2005) observou que os sistemas definidos de cultivo embrionário que utilizaram macromoléculas sintéticas produziram baixas taxas de blastocistos.

A capacidade de maturação oocitária, fecundação e o subsequente cultivo de desenvolvimento de embriões, na ausência de proteínas derivadas do sangue, são passos significativos adiante ao desenvolvimento de um sistema completamente definido de produção *in vitro* de embriões, o qual pode ser avaliado e contribuir tanto em pesquisas fundamentais, bem como em programas de produção (GARDNER et al., 1994).

Atualmente, o principal problema em se utilizar soro fetal bovino (SFB) e albumina sérica bovina (BSA) na produção *in vitro* de embriões bovinos refere-se às barreiras sanitárias, pois essas duas substâncias, por serem produtos derivados sanguíneos, e ainda da própria espécie bovina, representam altos riscos de contaminação e transmissão de doenças, demonstrando ser um dos principais fatores limitantes na comercialização desses embriões (TORNESI et al., 1993; MILHAM et al., 1994). Dessa forma, o conhecimento sobre substâncias que exerçam a mesma função na suplementação protéica, e que possam substituir o SFB e o BSA nas etapas de maturação, fecundação, e cultivo faz-se necessário, pois assim será possível diminuir ou extinguir os riscos de contaminações.

Segundo Bielansky (1998), é certo que embriões livres de patógenos podem ser produzidos, porém ainda não estão estabelecidos os melhores métodos que proverão esta segurança. Sendo assim, o comércio internacional de embriões PIV pode ser mais seguro quando obtidos de doadoras com estado sanitário conhecido, comparados àqueles produzidos por fecundação de oócitos de animais abatidos comercialmente.

De acordo com Barlian et al. (1993), a ovalbumina é um suplemento protéico não aparentado ao BSA, mas que também possui a capacidade de manter a proliferação celular. Além disso, por ser de origem heteróloga (aves), os riscos de transmissão de doenças aos bovinos são menores. Sistemas semidefinidos ou definidos, livres de contaminantes e patógenos, poderão contribuir com consideráveis avanços à produção *in vitro* de embriões bovinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Soro Fetal Bovino (SFB) como fonte de suplementação protéica na produção *in vitro* de embriões.

A suplementação do meio de cultura com fontes protéicas de origem animal apresentam os melhores resultados na maturação oocitária e no desenvolvimento *in vitro* de embriões (CAROLAN et al., 1995; MINGOTI, 2000; VANROOSE et al., 2001). O SFB é uma fonte protéica muito utilizada nos meios de cultura, e que promove o aumento na produção *in vitro* de embriões bovinos (ALI e SIRARD, 2002).

A suplementação protéica com soro fetal bovino (SFB) é benéfica ao desenvolvimento oocitário e embrionário *in vitro*. No entanto, impossibilita investigar as necessidades nutricionais do oócito e do embrião durante as fases de desenvolvimento, pois o SFB é composto por uma variedade de substâncias, ou componentes indefinidos, incluindo os ácidos graxos, fatores de crescimento, substratos energéticos, aminoácidos e vitaminas, com concentrações variáveis dependendo do lote, remessas e fornecedores. Ainda por ser proveniente do fluido formado pela coagulação sangüínea de bovinos, o SFB pode introduzir uma série de componentes patogênicos nos sistemas de cultivo (BAVISTER et al., 1992; KRISHER et al., 1999; HAN e NIWA, 2003), e ainda pode estar relacionado ao nascimento de fetos gigantes produzidos *in vitro*, ou síndrome do bezerro gigante, “large offspring syndrome” (LOS) (FARIN e FARIN, 1995).

SFB e BSA são as fontes protéicas mais comumente utilizadas como suplemento do meio de cultura para produção *in vitro* de embriões bovinos (MINGOTI, 2000). No entanto, estudos indicaram que o uso do SFB tem sido superior ao BSA como suplemento protéico adicionado ao meio de MIV, durante a etapa de maturação oocitária, pois foi demonstrada maior viabilidade dos oócitos e maior expansão das células do *cumulus* (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1986; SANBUISHO e THRELFALL, 1988; ANCIOTO, 2004).

O fluido do oviduto é o ambiente no qual ocorre a capacitação do espermatozóide, a fecundação, o transporte embrionário e o desenvolvimento inicial. As proteínas mais abundantes encontradas no fluido do oviduto são a albumina e a imunoglobulina G (LEESE, 1988). *In vitro*, embriões de algumas espécies podem ser cultivados durante o estágio de duas células com meio contendo fontes protéicas, como SFB ou BSA (KANE, 1985).

Foi reportado por diversos autores, que o SFB promove efeitos benéficos na PIV de embriões, pela presença dos fatores de crescimento e aminoácidos (KESKINTEPE et al., 1995), substratos energéticos e vitaminas (TAKAHASHI e FIRST, 1992), peptídeos, proteínas e citrato (KESKINTEPE et al., 1995), e hormônios esteróides (MINGOTI et al., 1995).

A adição de SFB ao meio de maturação não influenciou a taxa de maturação oocitária, ou seja, a porcentagem de oócitos que atingiram o estágio de MII (metáfase II), sugerindo que a maturação nuclear pode ser um processo independente da suplementação do meio de cultura (SUSS et al., 1988; MINGOTI et al., 1995), entretanto influenciou durante a etapa de fecundação *in vitro* (MINGOTI et al., 1995), e durante a etapa de cultivo *in vitro*, pois as proteínas sintetizadas na etapa de maturação persistem e influenciam no desenvolvimento embrionário inicial (SIRARD et al., 1998).

Oócitos imaturos cultivados *in vitro* são capazes de retomar a meiose e atingir a maturação nuclear (MII), entretanto, são poucos os competentes para suportar o desenvolvimento embrionário até a implantação. É provável que mais de um fator seja responsável pela variação na capacidade de diferentes fontes protéicas em darem suporte ao desenvolvimento *in vitro* de embriões. Diversos aspectos relacionados ao processo de maturação *in vitro* dos oócitos podem interferir no desenvolvimento embrionário, dentre eles, a deficiência na maturação citoplasmática (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1987), como a migração inadequada dos grânulos corticais para a periferia (DAMIANI et al., 1996), e a baixa concentração de glutatona intracelular (DE MATOS et al., 1996).

2.2. Histórico da Albumina - Fração Cohn / Fração V.

Com uma concentração circulante de 35–50 g/L, a albumina é o maior componente protéico no plasma sanguíneo. A necessidade de um componente estável como substituto de sangue, que salvaria vidas durante a Segunda Guerra Mundial, motivou o bioquímico de Harvard, Edwin Cohn, a desenvolver métodos de quebrar o protoplasma em seus componentes individuais. Cohn explorou a solubilidade diferencial de proteínas de protoplasma a várias temperaturas, pH, sais e concentrações de solventes orgânicos, para identificar cinco frações de protoplasma humano: fibrinogênio, imunoglobulinas, transferrina, lipoproteínas, e outros componentes que teriam significado comercial posteriormente (COHN et al., 1947). A quinta fração produzida por esse processo foi a albumina, e por isso, essa proteína geralmente é chamada Fração V. Este nome tem sido utilizado como sinônimo universal para a albumina.

A metodologia original de Cohn (1947), envolveu manipulação da concentração de etanol a baixas temperaturas, e variações de pH para se isolar a albumina de protoplasma. Melhorias dos processos industriais logo acrescentadas ao método de Cohn, como a diálise, troca de íons, e várias técnicas de filtração foram importantes para aumentar a purificação. Como o protoplasma humano para fabricar albumina era de oferta limitada e caro, então a equipe de Cohn pensou originalmente que o processo de fracionamento pudesse ser adaptado para o protoplasma de bovinos. Sendo assim mais econômico e disponível na indústria de carne bovina, a albumina bovina estava isolada, e era efetiva em expansão de volume de protoplasma, mas seu uso era potencialmente mortal em humanos.

A principal função da albumina é atuar como transportadora. As propriedades ligantes da albumina, como proteína de transporte, incluem afinidades por ácidos graxos, metais e íons, hormônios endógenos e substâncias exógenas ao plasma sanguíneo.

Para se ligar, a albumina pode exibir afinidade muito alta, mas também pode mostrar alta taxa de dissociação sob certas condições. A afinidade é hidrofóbica, mas também pode ser de natureza covalente ou iônica. Enquanto a prevalência de ligantes tem pouco efeito no desempenho da albumina como um dilatador de volume de protoplasma, os ácidos graxos podem aumentar sua estabilidade, e causar dificuldades em aplicações de alta purificação como imunoenaios e química clínica (JOHANSON, 1981).

A estrutura da albumina é altamente conservada entre várias espécies de mamíferos, sendo a homologia entre BSA e albumina sérica humana (HSA) de 76%. No entanto, as diferenças entre BSA e HSA eram grandes o bastante para fazer a molécula perigosamente alergizante em uma porcentagem pequena de pacientes infusos. A purificação de BSA de protoplasma bovino se tornou um método, por conseguinte, à procura de uma aplicação, um projeto à espera do aparecimento de diagnósticos modernos e cultura celular. Além do Fracionamento de Cohn, foram usadas modificações para produzir alta purificação de BSA. Ainda, muitos métodos industriais empregam o etanol ou diversos outros solventes orgânicos.

2.3. Albumina Sérica Bovina (BSA) como fonte de suplementação protéica na produção *in vitro* de embriões.

Assim como o SFB, a albumina sérica bovina (BSA) é uma das fontes protéicas mais comumente utilizadas como suplemento do meio de cultura para produção *in vitro* de embriões bovinos (MINGOTI, 2000). A albumina sérica bovina, geralmente, é utilizada como fonte de proteína em meios de cultivo e também por promover efeitos benéficos durante o desenvolvimento embrionário com a sua propriedade de ligação, pois dessa forma protege contra componentes tóxicos presentes nos meios de cultura (FLOOD e SHIRLEY, 1991), também possui a capacidade de quelar metais pesados e equilibrar o pH (MEHTA e KIESSLING, 1990), e ainda pela propriedade surfactante previne adesão de células a superfícies plásticas e de vidro (BAVISTER, 1981; PINYOPUMINTR e BAVISTER, 1994).

O BSA tem sido utilizado em meios de cultura como substituto do SFB. Entretanto, meios que contém BSA, ainda que livres de ácidos graxos, livres de globulinas e com poucas endotoxinas, são considerados semidefinidos, pois podem conter outras proteínas e diversos contaminantes (KRISHER et al., 1999).

A albumina, normalmente, é necessária para auxiliar a capacitação espermática e a fecundação *in vitro*, mas os mecanismos dessa ação ainda não são bem compreendidos. O preparo comercial de albumina sérica é contaminado com uma variedade de outras proteínas e compostos, sendo sua atividade biológica variável (KANE e HEADON, 1980; FLOOD e SHIRLEY, 1991). Preparações comerciais de albumina sérica são contaminadas com outras proteínas, bem como com ácidos graxos e outras moléculas pequenas (KANE e HEADON, 1980; BATT e MILLER, 1988). As pequenas moléculas contaminantes incluem fatores embriotróficos de crescimento, os quais estimulam a divisão celular e o desenvolvimento de mórulas e blastocistos (KANE, 1985). Até mesmo diferentes lotes de albumina sérica bovina da mesma fonte diferem na composição, especialmente no que se relaciona aos valores de ácidos graxos (CHEN, 1966), promotores e fatores de crescimento, e à capacidade de dar suporte ao desenvolvimento embrionário, em várias espécies (KANE, 1985).

Nos estudos realizados por Eckert e Niemann (1995), a formação de pronúcleo foi retardada em meio com ausência de suplementação protéica, indicando que o BSA é necessário para regular a fecundação *in vitro*, mas em condições experimentais, a suplementação protéica não foi necessária para a maturação e para o desenvolvimento *in vitro* até o estágio de blastocisto. No entanto, Ali e Sirard (2002) reportaram que o BSA afetou a maturação oocitária, pois causou atraso no início da meiose, e também alterações no desenvolvimento embrionário, diminuindo a capacidade de desenvolvimento aos estádios de mórula e blastocisto, embora tenha sido observado efeito estimulatório a blastulação.

Visconti et al. (1995) executaram diferentes testes e ensaios para determinar quais fatores eram necessários para: capacitação espermática, reação acrossomal e capacidade de formação de pronúcleo. Na ausência de BSA, eles descobriram que a proteína de fosforilação da tirosina 95/116 hexoquinase era limitada e que à medida que a concentração de BSA era aumentada, a intensidade da proteína de fosforilação de tirosina aumentava, revelando o valor máximo perto de 3 mg/mL de BSA. O BSA pode ser considerado um componente variável do meio de MIV visto que a preparação comercial apresenta um produto quimicamente impuro. Por essa razão, qualquer meio de maturação contendo BSA comercial não pode ser considerado definido quimicamente (KANE, 1987). *In vivo*, uma das principais funções do BSA é servir como transportador de nutrientes (JOHANSON, 1981).

2.4. Macromoléculas quimicamente definidas utilizadas na produção *in vitro* de embriões.

Foi relatado que o SFB e BSA podem ser substituídos por macromoléculas sintéticas, como a polivinil pirrolidona (PVP) ou álcool polivinílico (PVA) em cultivo inicial de embriões de hamster (KANE e BAVISTER, 1988), coelho (KANE, 1985), e camundongo (ZHANG e ARMSTRONG, 1990). No entanto, possuem resultados controversos, e foi reportado que a formação do pronúcleo foi retardada, quando o meio de fecundação continha PVA (ECKERT e NIEMANN, 1995).

Devido às possíveis contaminações por patógenos (vírus e príons), além dos efeitos tóxicos em meios de cultura com adição de fontes protéicas de origem sangüínea, tem sido proposta e preconizada a substituição de SFB e BSA por macromoléculas quimicamente definidas, ou macromoléculas sintéticas (THOMPSON, 1999; 2000).

Meios de cultura definidos são essenciais para a compreensão das necessidades nutricionais de oócitos e embriões (LIU e FOOTE, 1995; GANDHI et al., 2000), bem como para o estudo de substâncias adicionadas ao meio de cultura, que poderão promover incremento e melhoria nos índices da biotécnica de PIV de embriões (GESHI et al., 2000). No entanto, embriões cultivados em meios totalmente definidos, apresentaram bloqueio no desenvolvimento (CAMOUS et al., 1984), redução da viabilidade, em comparação aos cultivados em meios suplementados com SFB e BSA (WRIGHT e BONDIOLI, 1981; PINYOPUMMINTR e BAVISTER, 1994; KIM et al., 1996; KESKINTEPE e BRACKETT, 1996).

Segundo Uto e Yamahama (1996), o PVA, macromolécula sintética, é uma alternativa razoável para substituir o BSA na fecundação *in vitro*, e apresenta um lento progresso no sistema para obtenção de um bom modelo de estudo dos diversos passos da ativação espermática. De acordo com o mesmo autor, foi possível obter taxas equivalentes de maturação em oócitos bovinos submetidos a meio definido comparado às condições de maturação padrão com soro. Além disso, o desenvolvimento embrionário subsequente é melhorado após maturação na ausência de soro (GARDNER et al., 2001).

De acordo com os resultados de Eckert e Niemann (1995), a presença ou a ausência de proteína na maturação e/ ou no meio de cultivo não afetou significativamente o desenvolvimento *in vitro* até o estágio de mórula ou blastocisto. Já Thompson (1999) observou que o nível de proteína total e a utilização de substratos energéticos são baixos em blastocistos cultivados em meio suplementado com PVA, quando comparado àqueles cultivados em meio suplementado com SFB ou BSA. Dessa forma, o PVA não tem sido muito empregado como suplemento em meios de cultura, pois a habilidade de desenvolvimento adquirida pelo oócito durante o processo de maturação é originário, em grande parte, pela síntese de proteínas que ocorre nas primeiras etapas do desenvolvimento (SIRARD et al., 1998).

Outros autores reportaram que os meios completamente definidos, livres de proteínas, e suplementados com álcool polivinílico (PVA) ou polivinil pirrolidona (PVP) apresentam baixas taxas de desenvolvimento, e resultados críticos quanto à viabilidade, número de células e taxas de prenhez, quando comparados aos resultados obtidos com os meios indefinidos ou semidefinidos, suplementados com SFB e BSA (KESKINTEPE e BRACKETT, 1996). Enquanto que os sistemas semidefinidos, contendo BSA nas etapas de MIV, FIV e CIV, resultam em desenvolvimento e taxa de eclosão semelhantes aos que utilizam SFB (GANDHI et al., 2000).

2.5. Definição, classificação e propriedades das proteínas.

Proteína é uma macromolécula cujos monômeros são α -aminoácidos. As proteínas são constituintes dos tecidos biológicos, e muitas funcionam como enzimas. As proteínas são classificadas quanto à estrutura molecular em:

- Proteínas simples ou homoproteínas: são constituídas somente por aminoácidos.

- Proteínas complexas, conjugadas ou heteroproteínas: apresentam a cadeia de aminoácidos ligada a um radical diferente, ou seja, um grupo prostético. Dependendo do grupo prostético, as proteínas podem ainda ser classificadas em: glicoproteínas, cromoproteínas, fosfoproteínas ou nucleoproteínas (NORTH, 1979).

2.6. Ovalbumina (OVA).

A ovalbumina ou albumina do ovo de galinha é uma albumina pertencente à classe das albuminas solúveis, proveniente da coagulação de proteínas. Há diversas albuminas, como: albuminas de tecidos animais, miogênio muscular, albumina sérica ou sangüínea, lactalbumina do leite, além de albuminas vegetais.

A separação da ovalbumina, assim como das albuminas séricas, ou outras proteínas sangüíneas, é realizada por eletroforese ou precipitações fracionadas com vários sais (BAHR e JOHNSON, 1991).

A OVA é a maior proteína constituinte da parte branca do ovo, ou seja, da clara. Participa com 54% da constituição de toda a porção branca do ovo, juntamente com os outros constituintes: ovomucóide (11%), ovotransferrina (13%), lisozima (3,5%), além de globulina e avidina. Possui aproximadamente 3% de carboidratos (BESLER e MINE, 1999).

A OVA é considerada uma fosfoproteína (o grupo prostético é o ácido fosfórico) com 386 aminoácidos (44kD) com um N ligante à cadeia de oligossacarídeos, sendo a síntese de OVA estimulada pelo estrógeno (BAHR e JOHNSON, 1991).

A porção branca do ovo, que é a substância gelatinosa protetora que envolve a gema (porção amarela), consiste de albumina dissolvida em água (BIOGRAPHIES CHEMISTRY, 2001).

A ovalbumina é uma das 30 proteínas diferentes que formam o albume, e contém todos os aminoácidos essenciais. Acredita-se que a formação do albume de aves esteja sob controle hormonal (hormônios estrogênicos, androgênicos e progesterônicos), mecânico e nervoso fazendo com que as células glandulares do magno (também chamada glândula albuminífera nas aves) secretem e depositem os extratos sobre a gema, que, no seu trajeto, gira sobre seu eixo. O ovo em formação percorre o magno em cerca de 3 horas (BURKE, 1996).

Enquanto a ovalbumina apresenta classificação quanto à função biológica de proteína de armazenagem (depósito protéico da porção branca do ovo de aves), as albuminas séricas apresentam a função de proteínas de transporte (como o transporte de ácidos graxos no sangue, manutenção das relações osmóticas entre o sangue circulante e os espaços teciduais). Enquanto a OVA possui peso molecular (medido por ultracentrifugação) de 45,0, coeficiente de difusão de 7,76 e coeficiente de sedimentação de 2,85, a albumina sérica apresenta 69,0, 5,94 e 4,6, respectivamente (NEURATH, 1965).

2.7. Produção *in vitro* de embriões bovinos.

A PIV é considerada como a terceira geração de biotecnologias da reprodução animal (THIBIER et al., 1992). Para muitas espécies de mamíferos, como os bovinos, embriões podem ser rotineiramente produzidos em laboratório até o estágio de blastocisto utilizando as técnicas de maturação *in vitro* de oócitos (MIV), seguido da fecundação *in vitro* (FIV) e posterior cultivo *in vitro* (CIV), ou de desenvolvimento.

2.7.1. Maturação *in vitro*.

A capacidade de oócitos mamíferos em maturar *in vitro* está correlacionada com a atividade ovariana, o crescimento folicular e a presença ou ausência de células do *cumulus*, formando o complexo *cumulus*-oócito (COC), sendo esse último, necessário para o transporte de energia e a promoção da maturação no oócito bovino. A presença de células do *cumulus* circundando os oócitos parece ser mais importante para a maturação *in vitro* que até mesmo a atividade ovariana ou o tamanho folicular (SATO et al., 1977; FUKUI e SAKUMA, 1980). A maturação de oócitos advindos de folículos com vários tamanhos dependem de diferentes exigências nutricionais *in vitro*, pois estão em diferentes estádios de desenvolvimento (HAIDRI e GWATKIN, 1973).

A etapa de maturação *in vitro* possui grande influência no êxito da PIV. Durante este período devem ocorrer a maturação nuclear e citoplasmática do oócito, tornando-o apto a suportar o desenvolvimento embrionário. De acordo com Gordon (1994), os oócitos retomam a meiose espontaneamente em meio de cultivo apropriado. Durante o processo de desenvolvimento folicular, os oócitos passam por fases de crescimento, e no estágio dictiátenuo adquirem a habilidade de sofrer redução meiótica, ou seja, adquirem competência para completar o processo meiótico (TSAFRIRI, 1985; LONERGAN et al., 1999).

Durante a maturação meiótica ocorrem diversas alterações nucleares e citoplasmáticas, incluindo a quebra da vesícula germinativa (GVBD), a condensação dos cromossomos, a extrusão do primeiro corpúsculo polar (CP) e a formação do fuso meiótico (WITTMANN et al., 2001).

Os meios de cultura e suas suplementações são fundamentais no sistema de maturação *in vitro*. Muitos estudos têm examinado seus efeitos sobre o potencial de desenvolvimento de embriões bovinos, favorecendo a produção de blastocistos (HAWK e WALL, 1994; LIU e FOOTE, 1995; PINYOPUMMINTR e BAVISTER, 1996). Entretanto, alguns problemas atribuídos à maturação oocitária *in vitro* podem ser observados, entre eles, a deficiência de maturação citoplasmática. Ainda que oócitos cultivados *in vitro* apresentem, na sua maioria, maturação nuclear (Metáfase II), podem apresentar deficiências na maturação citoplasmática (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1987).

O processo de maturação *in vitro* de oócitos bovinos completa-se, aproximadamente, após 18 a 22 horas do início da MIV, e a maturação citoplasmática, aproximadamente, após 24 horas. Diversos fatores biológicos atuam de forma conjunta na preparação do oócito imaturo para que este se torne competente e passível de posterior desenvolvimento embrionário (YANG et al., 1998).

A maturação citoplasmática é considerada um processo de alterações estruturais e biológicas no gameta feminino, para que essa célula seja capaz de suportar os eventos da fecundação e do início do desenvolvimento. Algumas dessas mudanças incluem a redistribuição das organelas citoplasmáticas, entre elas, os grânulos corticais (GC), as mitocôndrias, o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático (DULCIBELLA et al., 1990). Em mamíferos, a migração dos grânulos corticais para a periferia do oócito é um importante indício de maturação citoplasmática e tem sido utilizado como critério para avaliar a maturação e a organização citoplasmática do oócito (DAMIANI et al., 1996; CARNEIRO et al., 2002).

Segundo Sirard (2001), o padrão de distribuição dos grânulos corticais pode ser utilizado na avaliação da maturação citoplasmática, já que essa migração dos GC para a periferia do oócito está associada à reorganização das organelas citoplasmáticas, bem como às alterações celulares que ocorrem, como o reposicionamento das mitocôndrias para a porção central no oócito, e modificações em número, tamanho e/ ou posição das demais organelas. Os GC são grânulos secretórios, capazes de promover o endurecimento da zona pelúcida (CHERR, et al., 1988), estão associados com um segmento do retículo endoplasmático liso, e após o início de maturação do oócito, ocorre um aumento do número de GC, principalmente após a ruptura da vesícula germinativa (GVBD) (CRAN, 1989).

Os grânulos corticais (GC) são responsáveis por auxiliar no bloqueio à polispermia (LIU et al., 2003). A liberação do conteúdo desses grânulos provoca uma reorganização extensa da ZP e /ou reação cortical da superfície vitelina, resultando em alterações bioquímicas, e também na liberação de enzimas que provocam o endurecimento da ZP e a inativação dos receptores espermáticos (ZP3) (FAIR et al., 1997).

De acordo com Wolf (2005), independentemente do meio utilizado na MIV de oócitos bovinos, o sistema de cultivo de desenvolvimento com 5% de O₂ produziu blastocistos com melhor qualidade proporcional massa celular interna (MCI): trofoblasto (TF), mas com maior quantidade de células em apoptose na região da MCI e no embrião total, em comparação ao cultivo de desenvolvimento com 20% de O₂.

Segundo Avelino (2004), a utilização de diferentes suplementos com antioxidantes no meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos, apesar de, geralmente não afetar a taxa de maturação nuclear (estádio de progressão nuclear), pode alterar a taxa de maturação citoplasmática avaliada pela distribuição dos grânulos corticais, bem como promover alterações na síntese de glutatona intracelular.

2.7.2. Fecundação *in vitro*.

A etapa de fecundação consiste no momento em que o espermatozóide fecunda o oócito maturo, promovendo elevações transitórias de cálcio livre intracelular, o que resulta na retomada da meiose e, posteriormente, na formação dos pronúcleos (KUPKER et al., 1998). A fecundação é um processo complexo que resulta na união de dois gametas, promovendo a restauração do número de cromossomos para o começo do desenvolvimento de um novo indivíduo (GORDON, 1994).

Os eventos iniciais da ativação se dividem em nucleares: retomada da meiose, transição anáfase – telófase, extrusão do segundo corpúsculo polar (CP); e citoplasmáticos, como a exocitose dos grânulos corticais GC), com conseqüente endurecimento da zona pelúcida (ZP) e bloqueio à polispermia (LIU et al., 2003).

A albumina sérica, usualmente albumina sérica bovina (BSA), dentre muitas funções, durante a etapa de fecundação *in vitro* (FIV), no momento da capacitação *in vitro*, tem a função de promover a remoção do colesterol da membrana plasmática do espermatozóide. Essa remoção é também essencial na regulação da sinalização intracelular que ocorre durante a capacitação espermática (ZENG et al., 1995).

Segundo Saeki et al. (1997), a formação dos pronúcleos ocorre em aproximadamente 7h após inseminação dos oócitos, já de acordo com Lim et al. (1999b), isso ocorre após 8 horas, e ainda de acordo com Méo Niciura (2005), os pronúcleos aparecem pela primeira vez após 12h da inseminação dos oócitos.

Em zigotos bovinos, é possível diferenciar o pronúcleo (PN) feminino do masculino por coloração e pelo tamanho entre 14 e 18h após a inseminação (hpi) dos oócitos, enquanto que a singamia dos pronúcleos ocorre aproximadamente a partir das 24hpi (MÉO NICIURA, 2005).

2.7.3. Desenvolvimento e Viabilidade Embrionária.

O sistema de desenvolvimento *in vitro* de embriões não apresenta a mesma eficiência que o sistema *in vivo* (VAN SOOM et al., 1997). Estudos comparativos entre embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* mostram importantes diferenças na morfologia, na estrutura, na bioquímica, no metabolismo e na expressão de genes, que podem levar a menor capacidade de desenvolvimento embrionário *in vitro* (KNIJN, et al., 2003).

Embriões derivados do sistema de produção *in vitro*, apresentam menores taxas de clivagem e assincronias na formação dos pronúcleos, masculino e feminino. Durante o cultivo, a taxa de desenvolvimento e o número de núcleos dos blastocistos produzidos *in vitro* é menor que dos blastocistos produzidos *in vivo*, e tem resultado em menores taxas de prenhez (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000).

No sistema de produção *in vitro* de embriões, vários parâmetros influenciam o desenvolvimento e a viabilidade embrionária, entre eles, as condições de cultivo dos oócitos durante o processo de maturação. Os meios de maturação e seus suplementos podem atuar de forma benéfica ou não no desenvolvimento embrionário (BRISON e SCHULTZ, 1997; KRISHER e BAVISTER, 1998).

A atmosfera gasosa é uma importante variável a ser considerada principalmente na etapa de CIV, pois o estresse oxidativo provocado por altas concentrações de O₂ pode influenciar na qualidade e na expressão gênica dos embriões, principalmente de genes que regulam a apoptose. A atmosfera *in vivo* normalmente encontrada em oviduto de mamíferos varia entre 5 a 8% de O₂, portanto, *in vitro*, as altas concentrações de O₂, cerca de 20%, na mistura gasosa exercem efeitos deletérios sobre o desenvolvimento embrionário (BAVISTER, 1995; FUKUI et al., 1999).

A redução da concentração de O₂ para, aproximadamente, 5% durante o CIV pode reduzir a presença de radicais livres de oxigênio e diminuir os efeitos deletérios

no DNA durante o desenvolvimento embrionário, e resultar em maiores taxas de produção de blastocistos, com maiores quantidades de células (TAKAHASHI et al., 2000).

A contagem do número de células em blastocistos é um dos parâmetros mais utilizados para caracterizar a qualidade embrionária *in vitro*. Durante o processo de desenvolvimento de embriões pré-implantação, as células embrionárias se diferenciam em trofoblasto (TF) ou massa celular interna (MCI). O TF é composto por células externas do blastocisto que originam as membranas extra-embrionárias, enquanto que as células da MCI originam o feto e contribuem em parte, para a formação das membranas extra-embrionárias (NEUBER et al., 2002). O desenvolvimento fetal normal é dependente do número de células totais do embrião (LANE e GARDNER, 1997), e o estabelecimento de uma proporção adequada entre MCI:TF é considerada essencial para assegurar a viabilidade embrionária (FLEMING, 1987).

A técnica de coloração diferencial por fluorocromo possibilita determinar a contagem das células da MCI e TF (IWASAKI et al., 1990). Embora não se tenha um parâmetro ideal para essa razão, tem-se adotado os valores de uma célula da MCI para duas de TF (AVELINO, 2004).

O desenvolvimento de um meio de cultivo livre de soro para embriões de animais domésticos é altamente desejável para facilitar estudos do desenvolvimento embrionário inicial e para aumentar a eficiência dos procedimentos de MIV e FIV (GARDNER et al., 1994).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

- Estudar os efeitos da substituição de proteínas derivadas sanguíneas da espécie bovina (SFB e BSA) pela ovalbumina, nas etapas de maturação, fecundação e cultivo no sistema de produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos.

3.2. Objetivos específicos

- Estabelecer e definir qual a concentração adequada de ovalbumina a ser utilizada nas etapas de MIV, FIV e CIV.
- Avaliar a influência da ovalbumina na maturação nuclear e na migração de grânulos corticais em oócitos bovinos.
- Analisar a capacidade de fecundação dos espermatozóides em meio contendo ovalbumina pela identificação dos pronúcleos masculino e feminino.
- Verificar os efeitos da ovalbumina nas etapas de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* e suas conseqüências no desenvolvimento embrionário *in vitro* (taxa de clivagem, taxa de produção de blastocistos e taxa de eclosão).
- Avaliar o desenvolvimento embrionário e a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* por coloração diferencial e contagem do número de células da massa celular interna (MCI), células do trofoblasto (TF) e células totais.

4. HIPÓTESE

A ovalbumina pode ser utilizada como fonte de suplementação protéica substituta ao SFB e BSA nas etapas de MIV, FIV e CIV de embriões bovinos, não alterando as taxas de maturação oocitária, formação de pronúcleos, clivagem, produção de blastocistos, eclosão, bem como número de células da MCI, TF e células totais.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Produção *in vitro* de embriões do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, durante o período de agosto de 2005 a novembro de 2006.

Para a realização dos experimentos foram utilizados ovários de fêmeas bovinas abatidas em frigoríficos localizados em Sertãozinho SP, e Taquaritinga, SP, cidades vizinhas a Jaboticabal.

5.1. Experimento I: Influência da concentração de ovalbumina na maturação nuclear e na migração de grânulos corticais em oócitos bovinos.

Neste experimento; avaliaram-se os efeitos da substituição do soro fetal bovino (SFB) por diferentes concentrações de ovalbumina (OVA) na maturação nuclear quanto ao estágio de progressão nuclear, e na maturação citoplasmática, quanto à distribuição dos grânulos corticais (GC), por representar um indício de maturação citoplasmática. Foi realizada a padronização da concentração adequada de ovalbumina, a qual foi utilizada nos experimentos seguintes.

5.1.1. Obtenção, seleção e maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

Ovários bovinos obtidos em abatedouro foram transportados ao laboratório, em solução salina a 28-32°C, e seus folículos antrais (com diâmetro de 3 a 7mm) foram aspirados com auxílio de seringas (20 mL) com extremidade de agulha (18-G). O fluido folicular aspirado foi transferido para tubo cônico de 50mL e decantado por 15min para a separação dos oócitos. Posteriormente, o sedimento foi transferido para placa de Petri e visualizado em microscópio estereoscópico, com aumento de 20 a 80 X.

Foram selecionados para a maturação, oócitos de *cumulus* compacto, com pelo menos, três a quatro camadas de células do *cumulus*, e ooplasma de granulação uniforme.

Os oócitos aspirados foram selecionados segundo Loos et al. (1991), onde:

- a) Grau I: revestimento com multicamadas de *cumulus* compacto, ooplasma homogêneo e complexo *cumulus*-oócito claro e transparente;
- b) Grau II: revestimento com 3 a 5 camadas de *cumulus* compacto, ooplasma homogêneo ou com regiões escuras na periferia;
- c) Grau III: pouco revestimento de células do *cumulus* (1 a 3 camadas) e ooplasma irregular com picnose;
- d) Grau IV ou atrésico: *cumulus* expandido com células escuras e em grumos, e complexo *cumulus*-oócito escuro e irregular;
- e) Desnudo: sem camadas do *cumulus* e com ooplasma uniforme ou com granulações.

Os oócitos selecionados, de grau I, II e III (Figura 1a e a₁), foram divididos igualmente em quatro grupos, lavados duas vezes em meio de lavagem (suplementado de acordo com o respectivo meio de maturação), uma vez em meio de maturação, correspondente ao grupo experimental, e distribuídos em número de 20 a 25 oócitos por microgota (100µL), sob óleo mineral (Dow Corning 200 Fluid 50CST), com meio de maturação específico para cada tratamento, como descrito a seguir.

A distribuição, aleatória entre os quatro grupos experimentais, foi seguida de cultivo em incubadora à temperatura de 38,5°C com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada, durante 24h.

Os oócitos foram maturados *in vitro* (MIV) em meio TCM 199 com sais de Earle (Gibco 31.100; Grand Island, NY, EUA) suplementado de acordo com os tratamentos: Controle (10% SFB; Crypion®) ou OVA (Inlab® Cód.1860; nas concentrações: 2, 4 e 6mg/mL OVA) de acordo com a Tabela 1, e 1,0µg/mL de FSH (Pluset®, Calier), 50UI/mL de hCG (Profasi®, Serono), 1,0µg/mL de estradiol (Sigma E-2758), 0,2mM de piruvato de sódio (Biochemical 44094) e 83,4µg/mL de amicacina (Biochimico).

Tabela 1. Apresentação esquemática dos tratamentos utilizados na etapa de maturação *in vitro* de oócitos bovinos (Experimento I).

| Maturação –MIV | Suplementação |
|-----------------------|----------------------|
| Controle | SFB (10%) |
| OVA 2 | OVA (2mg/mL) |
| OVA 4 | OVA (4mg/mL) |
| OVA 6 | OVA (6mg/mL) |

SFB = soro fetal bovino; OVA = ovalbumina.

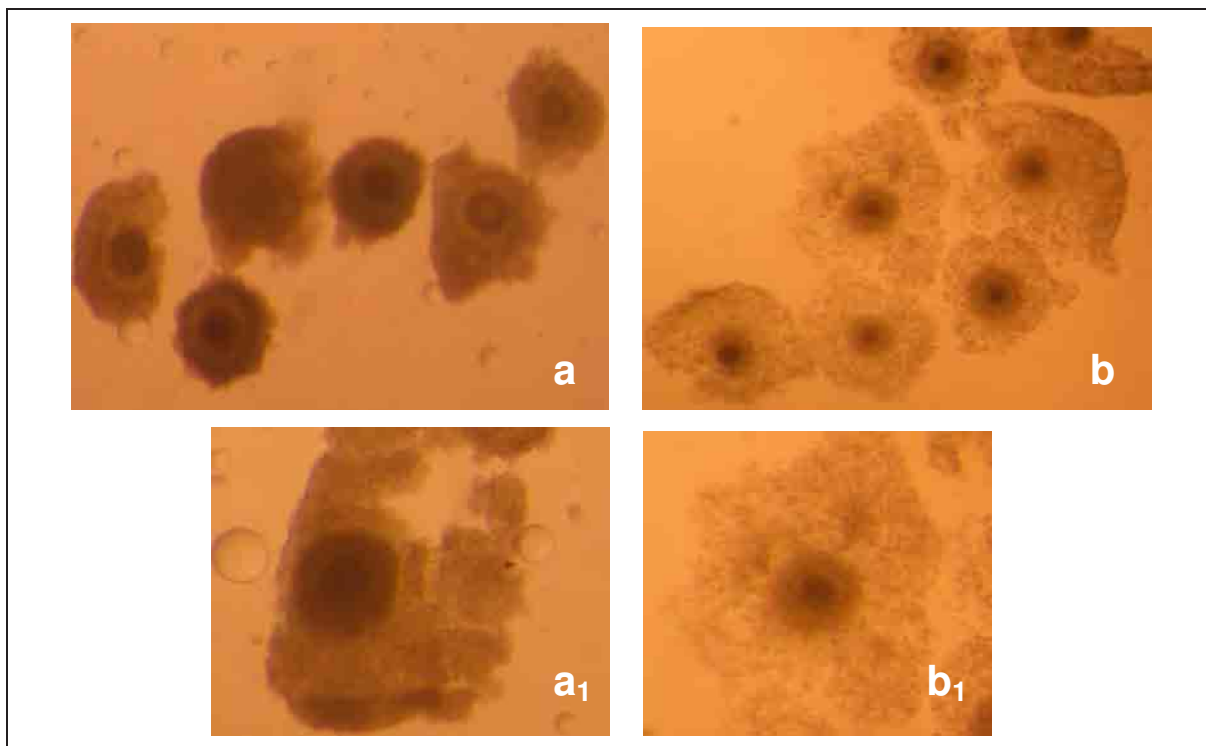


Figura 1. Aspecto morfológico dos COCs e oócitos bovinos selecionados para a maturação *in vitro*. (a) e (a₁) Oócitos antes da MIV. (b) e (b₁) Oócitos com expansão das células do *cumulus*, após 24 h de maturação *in vitro*.

5.1.2. Avaliação da maturação oocitária.

A maturação oocitária foi avaliada pelo estágio da progressão nuclear (maturação nuclear, para o estágio de MII), e pela migração dos grânulos corticais (GC) para a periferia da membrana citoplasmática (indício de maturação citoplasmática). Para a coloração dos GC foi utilizada a metodologia descrita por Cherr et al. (1988) com modificações (AVELINO, 2004).

Após maturação por 24h (Figura 1b e b₁), foi realizada a remoção das células do *cumulus* (Figura 2a e a₁), com 0,2% de hialuronidase (Hyalozima®, Aspen) em PBS livre de Ca²⁺, com 0,1% de álcool polivinílico (PVA; Sigma P-8136), e a remoção da zona pelúcida (Figura 2b e b₁) com pronase (0,5% em PBS) por 3min e depois em solução ácida (PBS pH 2,5) por 10 seg, à temperatura ambiente.

Posteriormente à remoção da ZP, os oócitos foram fixados em 3% de formaldeído (Mallinckrodt 5016), em tampão salina fosfato (PBS), por 30min à temperatura ambiente, e incubados a 4°C durante a noite, em solução de bloqueio – SB [PBS com 1mg/mL de albumina sérica bovina (BSA; Sigma A-6003), 100mM de glicina (Plusone 17-1323-01) e 0,2% de azida de sódio (Sigma S-2002)].

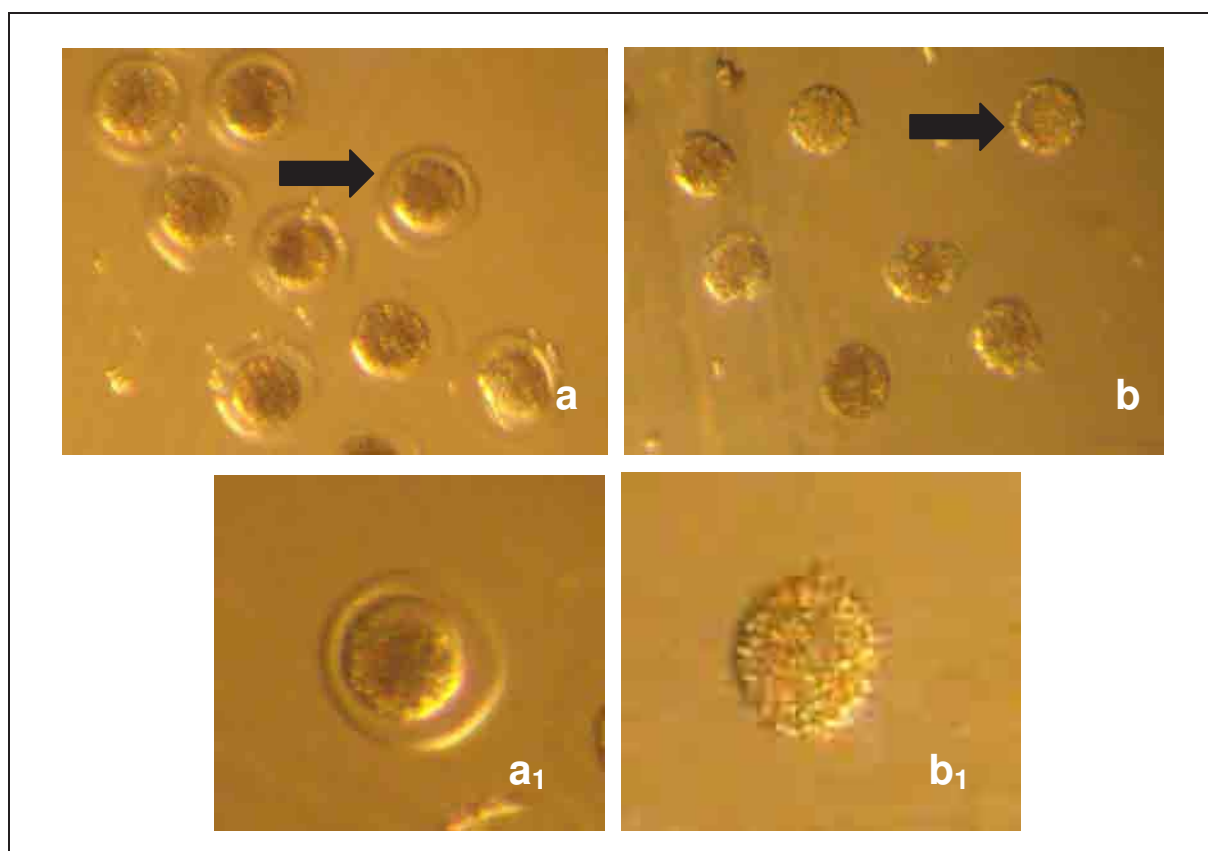


Figura 2. Aspecto morfológico de oócitos bovinos após a remoção das células do *cumulus* e durante a etapa de remoção da zona pelúcida (ZP). (a) e (a₁) Oócitos com ausência das células do *cumulus* e com a presença da ZP (Seta). (b) e (b₁) Oócitos com ZP removidas (Seta).

Para a permeabilização, os oócitos foram tratados por 15 min a 38°C em solução de bloqueio (SB) acrescida de 0,1% de Triton X-100 (USB 22686). Posteriormente, foram incubados em 10µg/mL de *Lens culinaris* aglutinina conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC-LCA); esta lecitina se liga especificamente à α -D-manose presente nos GC. Em seguida, os oócitos foram lavados 3 vezes em SB, corados com 10 µg/mL de Hoechst 33342 em SB por 10 minutos, lavados novamente em SB, montados em lâminas e visualizados em microscópio de epifluorescência (Olympus – IX-FLA-70, Tóquio, Japão). Em cada grupo experimental, os oócitos foram avaliados quanto à maturação nuclear pela progressão meiótica (excitação 330-385nm e emissão 420-490nm para o Hoechst) e quanto à maturação citoplasmática pela distribuição dos grânulos corticais (excitação 460-490nm e emissão 515nm, para o FITC).

Os oócitos foram classificados quanto à maturação nuclear pelo estágio de progressão nuclear, e foram considerados maduros quando no estágio de MII. Quanto à maturação citoplasmática, os oócitos foram classificados de acordo com a distribuição dos GC, sendo considerados imaturos aqueles com GC dispostos em “clusters” distribuídos por todo o citoplasma; parcialmente maduros ou em transição, os oócitos com GC migrando para a periferia; e maduros os oócitos com GC dispostos na periferia de forma homogênea; de acordo com a classificação de HOSOE e SHIOYA (1996) e MÉO (2002).

Após o estabelecimento da melhor concentração da ovalbumina, essa foi adotada nos experimentos seguintes.

5.2. Experimento II: Avaliação da influência da ovalbumina como suplemento protéico na maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

Neste experimento; avaliou-se a influência da substituição do soro fetal bovino (SFB) e da albumina sérica bovina (BSA) pela ovalbumina (OVA) na maturação nuclear quanto ao estágio de progressão nuclear, e na maturação citoplasmática, quanto à distribuição dos grânulos corticais (GC).

5.2.1. Obtenção, seleção e maturação *in vitro* dos oócitos bovinos.

A metodologia para obtenção, seleção e maturação *in vitro* dos oócitos bovinos foi desenvolvida como anteriormente, descrita no item 5.1.1., com exceção da suplementação protéica utilizada na etapa de MIV.

Os oócitos foram maturados *in vitro* (MIV) em meio TCM 199 com sais de Earle (Gibco 31.100), suplementado de acordo com os tratamentos: SFB (10% SFB; Crypion®), BSA (Inlab®; 4mg/mL BSA), OVA (Inlab®; 4mg/mL OVA) ou BO (2mg/mL BSA + 2mg/mL OVA), conforme a Tabela 2, e 1,0µg/mL de FSH (Pluset®, Calier), 50µg/mL de hCG (Profasi®, Serono), 1,0µg/mL de estradiol (Sigma E-2758), 0,2mM de piruvato de sódio (Biochemical 44094) e 83,4µg/mL de amicacina (Biochimico), durante 24h à temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

Tabela 2. Apresentação esquemática dos tratamentos utilizados na etapa de maturação *in vitro* de oócitos bovinos (Experimento II).

| Maturação –MIV | Suplementação |
|-----------------------|-----------------------------|
| Controle | SFB (10%) |
| BSA | BSA (4mg/mL) |
| OVA | OVA (4mg/mL) |
| BO | BSA (2mg/mL) e OVA (2mg/mL) |

SFB = soro fetal bovino; BSA = albumina sérica bovina; OVA = ovalbumina;
BO = BSA + OVA

5.2.2. Avaliação da maturação oocitária.

A metodologia para avaliação dos oócitos bovinos maturados sob diferentes suplementos protéicos (SFB, BSA, OVA ou BSA+OVA) foi desenvolvida como descrito anteriormente no item 5.1.2.

5.3. Experimento III: Avaliação da influência da ovalbumina como suplemento protéico na fecundação *in vitro*.

Neste experimento avaliou-se a influência da substituição da albumina sérica bovina (BSA) pela ovalbumina (OVA) na etapa de fecundação *in vitro* de oócitos bovinos, através da identificação e da visualização de pronúcleos masculino e feminino.

5.3.1. Obtenção, seleção e maturação *in vitro* dos oócitos bovinos.

A metodologia para obtenção, seleção e maturação *in vitro* dos oócitos bovinos foi desenvolvida como anteriormente, descrita no item 5.1.1., com exceção da suplementação protéica utilizada na etapa de MIV.

Os oócitos foram maturados *in vitro* (MIV) em meio TCM 199 com sais de Earle (Gibco 31.100), suplementado de acordo com os tratamentos: SFB (10% SFB), BSA (4mg/mL BSA) ou OVA (4mg/mL OVA), e 1,0µg/mL de FSH (Pluset®, Calier), 50µg/mL de hCG (Profasi®, Serono), 1,0µg/mL de estradiol (Sigma E-2758), 0,2mM de piruvato de sódio (Biochemical 44094) e 83,4µg/mL de amicacina (Biochimico), durante 24h à temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

5.3.2. Fecundação *in vitro* (FIV) dos oócitos bovinos.

Os oócitos maturados *in vitro* sob os diferentes suplementos protéicos (SFB, BSA ou OVA), foram divididos aleatoriamente pela metade, para formação de seis tratamentos (Tabela 3) durante o processo de fecundação *in vitro*.

A fecundação *in vitro* (FIV) foi realizada após 24h de MIV, em gotas, cobertas por óleo mineral, de 100µL de meio TALP-FIV [meio TALP com 30µg/mL de heparina (Sigma H-3149), 18µM de penicilamina (Sigma P 4875), 10µM de hipotaurina (Sigma H-1384) e 1,8µM de epinefrina (Sigma E-4250)], com 0,2mM de piruvato, 83,4µg/mL

de amicacina e suplementado de acordo com os tratamentos: 6mg/mL de BSA, ou 6mg/mL de OVA.

O sêmen, congelado em palhetas de 0,5 mL, foi aquecido em água a 35°C por 30seg e preparado por centrifugação em gradiente de Percoll (Sigma P-4937), de 45 e 90%, a 900xg por 30min, em meio TALP-sêmen [meio TALP com 10mM de hepes ácido (J.T. Baker 4018-01)].

Foram recuperados 30µL do sedimento, que foram avaliados quanto à concentração e a motilidade espermática. A concentração final foi ajustada para 25×10^6 espermatozoides móveis/mL com meio TALP-FIV sob óleo mineral. Posteriormente, 8µL do sêmen diluído foram adicionados às gotas contendo de 20 a 25 oócitos, obtendo-se a concentração final de 2×10^5 espermatozoides vivos/gota (2×10^6 /mL), resultando em $8-10 \times 10^3$ de espermatozoides por oócito. O período de co-incubação foi de 18 a 20h, em incubadora à temperatura de 38,5, 5% de CO₂ em ar e umidade saturada.

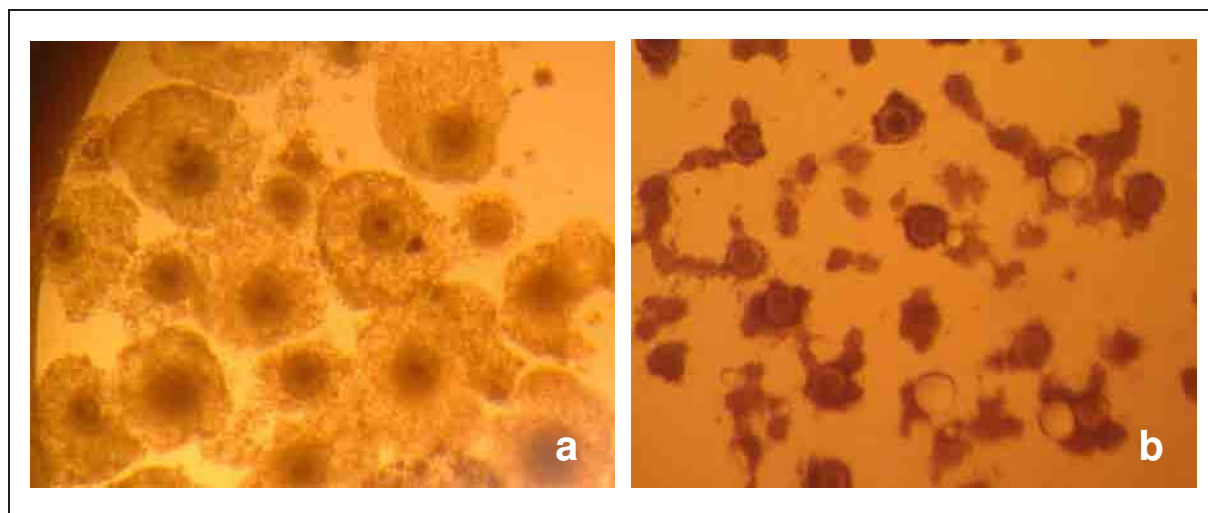


Figura 3. Aspecto morfológico dos COCs, oócitos e prováveis zigotos. (a) Oócitos com expansão das células do *cumulus*, após 24 h de MIV. (b) Prováveis zigotos após 18 a 20 h de FIV.

Tabela 3. Apresentação esquemática dos tratamentos utilizados nas etapas de maturação e fecundação *in vitro* de oócitos bovinos (Experimento III).

| Grupos | Maturação –MIV | Fecundação – FIV |
|---------------|-----------------------|-------------------------|
| CONT | SFB (10%) | BSA(6mg/mL) |
| SO | SFB (10%) | OVA (6mg/mL) |
| BB | BSA (4mg/mL) | BSA (6mg/mL) |
| BO | BSA (4mg/mL) | OVA (6mg/mL) |
| OB | OVA (4mg/mL) | BSA (6mg/mL) |
| OO | OVA (4mg/mL) | OVA (6mg/mL) |

SFB = soro fetal bovino; BSA = albumina sérica bovina; OVA = ovalbumina.

5.3.3. Avaliação da formação de pronúcleos.

Dezoito a vinte horas após o início FIV, os possíveis zigotos (Figura 3b) tiveram as células do *cumulus* removidas por sucessivas pipetagens, posteriormente foram lavados em PBS com 2% de BSA, e corados com 10 µg/mL Hoechst 33342 em TCM-199 Hepes por 10 min, colocados entre lâminas e lamínulas, e avaliados quanto à presença de pronúcleos, e quanto ao número de PN, em microscópio de epifluorescência (excitação de 330-385nm e emissão de 420-490nm).

5.4. Experimento IV: Avaliação dos efeitos da ovalbumina nas etapas de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* e sua consequência no desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Neste experimento, foi avaliada a influência da ovalbumina nas diversas etapas da PIV (Produção *in vitro*) de embriões, desde a MIV, a FIV e o CIV, sob diferentes suplementos protéicos e diferentes combinações, pela análise da taxa de clivagem, taxa de produção de blastocisto, taxa de eclosão, número de células da massa celular interna e trofoblasto, e número total de células dos blastocistos.

5.4.1. Obtenção, seleção e maturação *in vitro* dos oócitos bovinos.

A metodologia para obtenção, seleção e maturação *in vitro* dos oócitos bovinos foi desenvolvida como anteriormente, descrita no item 5.3.1.

5.4.2. Fecundação *in vitro* (FIV).

A metodologia para fecundação *in vitro* foi desenvolvida como descrito anteriormente de acordo com o item 5.3.2.

5.4.3. Cultivo *in vitro* (CIV) dos prováveis zigotos.

Após o término da incubação com os espermatozóides, os prováveis zigotos (Figura 4) foram submetidos ao cultivo de desenvolvimento em placas de 4 poços Nunc®, com 500 µL de meio SOF, cobertos com óleo mineral, e suplementado de acordo com os tratamentos (SFB, BSA ou OVA; Tabela 4), atmosfera com baixa tensão de O₂ (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂), denominado sistema com 5% de O₂ em câmara modular (Billups-Rothenberg – Califórnia USA), em umidade saturada e mantida no interior de incubadora de cultivo à temperatura de 38,5°C, durante 7 a 8 dias, para atingirem o estágio de blastocisto (dia 0 = dia da fecundação).

Tabela 4. Apresentação esquemática dos tratamentos utilizados nas etapas de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* (Experimento IV).

| Grupos | Maturação –MIV | Fecundação – FIV | Cultivo – CIV |
|---------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|
| CONT | SFB (10%) | BSA(6mg/mL) | SFB(2,5%)+BSA(4mg/mL) |
| SBS | SFB (10%) | BSA (6mg/mL) | SFB (10%) |
| SOS | SFB (10%) | OVA (6mg/mL) | SFB (10%) |
| BBB | BSA (4mg/mL) | BSA (6mg/mL) | BSA (4mg/mL) |
| BOB | BSA (4mg/mL) | OVA (6mg/mL) | BSA (4mg/mL) |
| OOO | OVA (4mg/mL) | OVA (6mg/mL) | OVA (4mg/mL) |
| OBO | OVA (4mg/mL) | BSA (6mg/mL) | OVA (4mg/mL) |

SFB = soro fetal bovino; BSA = albumina sérica bovina; OVA = ovalbumina

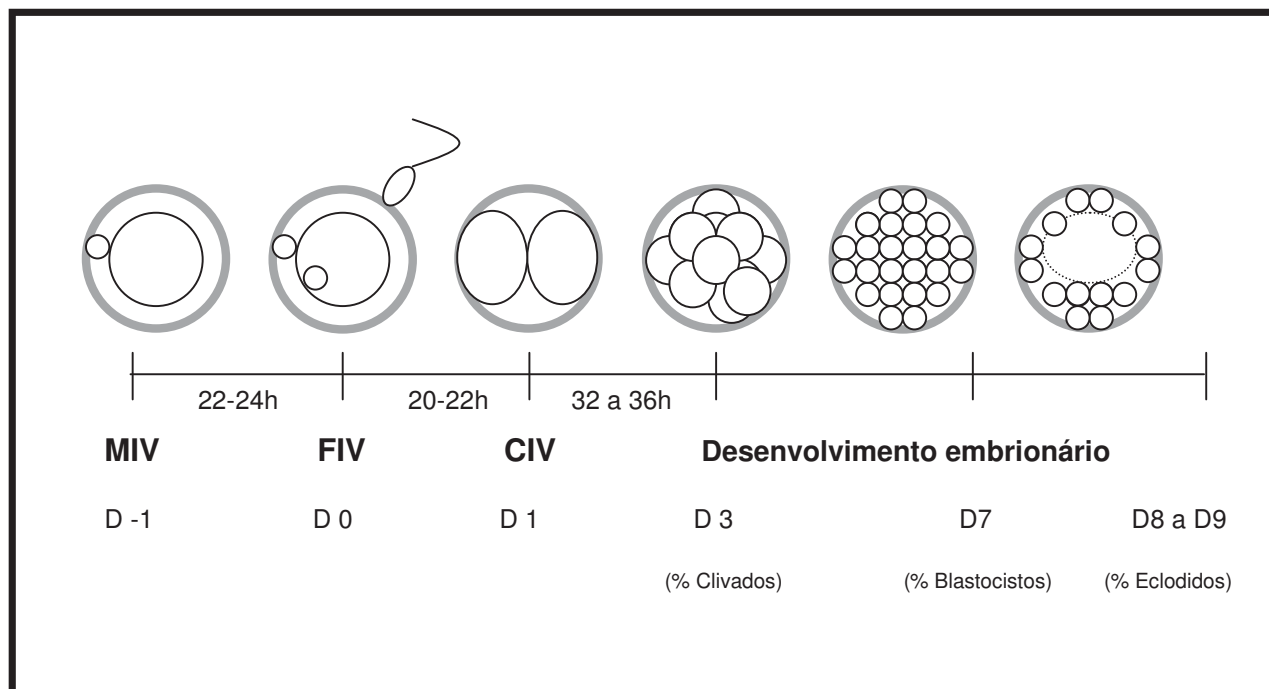


Figura 4. A PIV foi realizada mediante maturação (MIV) durante 24 horas, fecundação (FIV) e cultivo (CIV) de 18 a 20 horas após a inseminação (hpi). Decorridas 32 a 36 horas pós-inseminação (hpi) foi realizada a contagem da taxa de clivagem, no D7 foi verificada a taxa de produção de blastocistos e no D8 e no D9, avaliada a taxa de eclosão, com intuito de avaliar o efeito das diferentes fontes protéicas nas três etapas da PIV.

5.4.4. Quantificação das taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário e de eclosão dos embriões CIV.

A taxa de clivagem foi avaliada aproximadamente de 32 a 36 horas pós-inseminação (hpi), em microscópio estereoscópico (aumento de 50 X) e embriões de duas e quatro células foram considerados clivados.

No sétimo dia após a fecundação *in vitro*, foi avaliada a taxa de desenvolvimento até o estágio de blastocisto (BI). A eclosão foi avaliada no oitavo e no nono dia após a FIV.

5.4.5. Verificação da qualidade embrionária por meio do número de células da MCI, do TF, e total nos embriões CIV.

A qualidade morfológica dos blastocistos produzidos *in vitro* foi avaliada pela proporção do número de células da massa celular interna (MCI) e do trofoblasto (TF) em relação ao número total (T) de células.

A determinação da massa celular interna (MCI) e trofoblasto (TF) foi baseada na técnica de coloração diferencial por fluorocromo, descrita por Iwasaki et al. (1990).

Os blastocistos obtidos no dia 7 após a fecundação foram tratados com pronase (0,5% em PBS) por 3min e em seguida, por solução "Tyrodes Ácida" (pH 2,1) a 37°C por 40seg, para retirada da zona pelúcida. Posteriormente, os blastocistos foram lavados três vezes em meio TCM-199 Hepes com 10% de SFB e duas vezes em meio TCM-199 Hepes sem SFB. Os blastocistos foram incubados em gelo durante 10 minutos, em solução de ácido pícrico (10 mM; Reagen®) e PVP (3mg/mL; Sigma®) em PBS. Após lavagem em meio TCM-199 Hepes, foram incubados a 38,5°C por 30 minutos com soro de coelho anti-bovino na proporção de 1:10 em meio TCM-199 Bicarbonato. Após nova lavagem em meio TCM-199 com 10% de SFB, os embriões foram incubados a 38,5°C por mais 30 minutos em complemento de cobaia na proporção de 1:10 em meio TCM-199 Hepes acrescido

de 10 µg/mL de iodeto de propídio (Sigma® – P-4170) (corante não vital) e 10µg/mL de Hoechst 33342 (corante vital). Para finalização, foram lavados em PBS com 0,3% de BSA e fixados entre lâminas e lamínulas com glicerol, onde foram levemente achatados por pressão manual.

Os blastocistos foram avaliados em microscópio de epifluorescência (com filtro de excitação de 340-380 nm e emissão de 430 nm) quanto ao número de células da MCI (núcleos com fluorescência azul, corados pelo Hoechst 33342) e do TF (núcleos com fluorescência rosa, corados tanto pelo iodeto de propídio quanto pelo Hoechst) e total de células. A média (DP) do número de células total, na MCI e no TF, e a proporção MCI:TF, dos blastocistos foram determinados.

Na avaliação dos blastocistos (BI) quanto à proporção de MCI:TF, foram considerados de qualidade superior aqueles blastocistos que apresentaram razão igual ou superior a 1:2, de acordo com classificação de Avelino (2004).

5.5. Análise estatística.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa “*Statistical Analysis System*” (SAS Institute Inc, 1989), SAS/STAT Software, V 9.1. Cary: SAS Institute Inc. (LITTLELL et al., 1996).

Os resultados dos experimentos I, II, e IV foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), seguido pela comparação entre as médias pelo Teste de Tukey, com o procedimento GLM do SAS System (Versão 9.1). Para o experimento III foi utilizado o teste Qui-Quadrado (χ^2). O nível de significância de 5% foi utilizado em todos os experimentos.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Experimento I: Influência da concentração de ovalbumina na maturação nuclear e na migração de grânulos corticais em oócitos bovinos.

Para se determinar a melhor concentração de ovalbumina na maturação *in vitro* de oócitos bovinos, foram utilizados 676 oócitos, distribuídos nos quatro grupos experimentais em três repetições (159-180 oócitos por tratamento). No total dos oócitos avaliados, 503 (74,40%) atingiram o estágio de metáfase II e 301 (44,55%) apresentaram GC dispostos na periferia da membrana citoplasmática do oócito.

As taxas de maturação nuclear para os diferentes tratamentos estão descritas na Tabela 5 e demonstradas nas Figuras 5 e 6. Observamos que os grupos tratados com 4mg/mL OVA (82,66%) e 6 mg/mL OVA (77,05%) foram semelhantes ($p>0,05$) ao grupo controle tratado com 10% SFB (85,37%). Por outro lado, a taxa de maturação nuclear, avaliada pelo estágio de progressão nuclear, no grupo tratado com 2mg/mL OVA (50,83%) foi inferior ($p<0,05$) aos demais grupos.

Tabela 5. Valores médios (% \pm dp) de maturação nuclear (oócitos em metáfase II) após cultivo de maturação por 24h, em meios suplementados com 10% SFB (CONT), ou diferentes concentrações de ovalbumina, 2 (OVA 2), 4 (OVA 4) ou 6mg/mL (OVA 6).

| Grupos | Nº de oócitos | Maturação nuclear (médias % \pm dp) |
|--------|---------------|---------------------------------------|
| CONT | 180 | 85,37 \pm 4,77 ^a |
| OVA 2 | 159 | 50,83 \pm 8,42 ^b |
| OVA 4 | 167 | 82,66 \pm 0,63 ^a |
| OVA 6 | 170 | 77,05 \pm 5,82 ^a |

^{a,b} Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si ($p > 0,05$).

F = 15,63*, CV = 7,65%.

* = Significativo ($p < 0,05$),

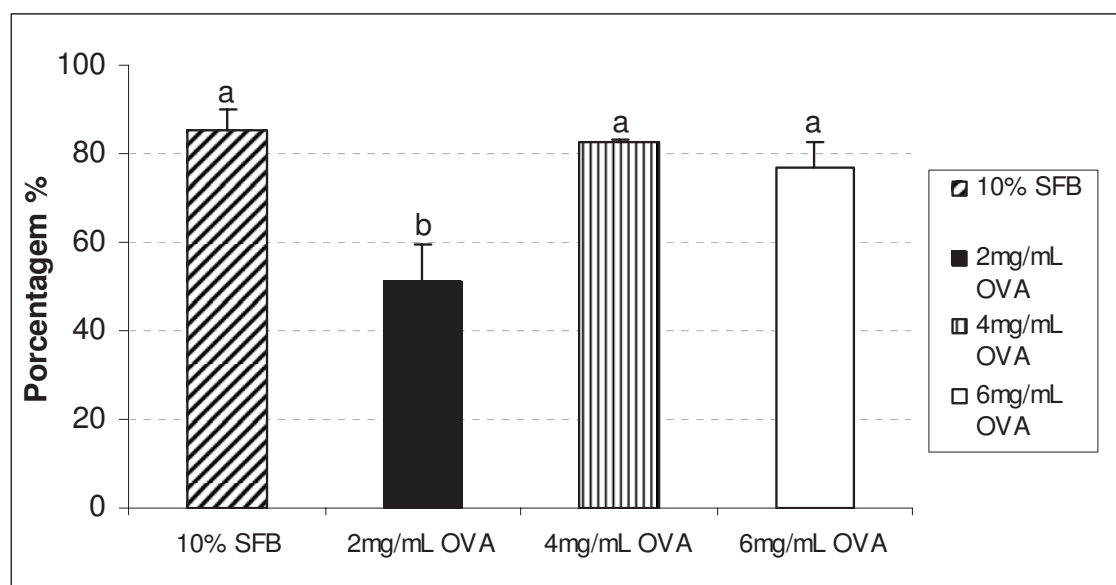


Figura 5. Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de oócitos em metáfase II, após 24h de maturação *in vitro*, em meios suplementados com 10% SFB, ou 2, ou 4 ou 6mg/mL de OVA.

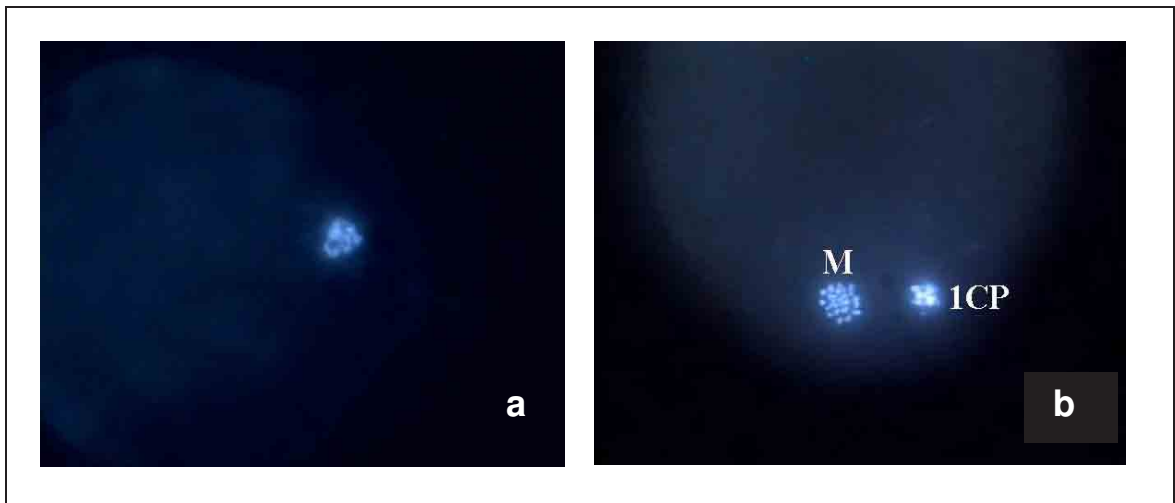


Figura 6. Aspecto morfológico da progressão nuclear em oócitos bovinos MIV por 24h, corados com Hoechst 33342 e avaliados sob microscopia de epifluorescência. (a) Oócito não maturo (VG); (b) Oócito maturo, apresentando metáfase II (M), com presença do primeiro corpúsculo polar (1CP).

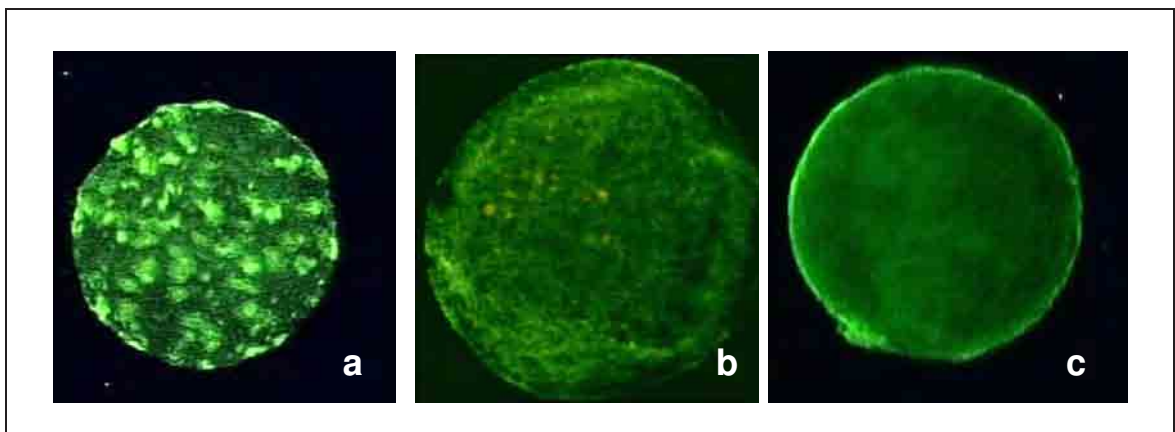


Figura 7. Aspecto morfológico da distribuição dos grânulos corticais em oócitos bovinos MIV por 24h, corados com lecitina (específica a α -D-manose) conjugada a FITC, e avaliados sob microscopia de epifluorescência. (a) Oócito apresentando GC dispostos em “clusters” no citoplasma (oócito imaturo); (b) Oócito apresentando GC dispostos em todo o citoplasma, no centro e na periferia (oócito em transição imaturo/maturo); (c) Oócito apresentando GC dispostos na periferia (oócito maturo).

A migração dos grânulos corticais para a periferia dos oócitos é utilizada como índice de maturação citoplasmática, pois representa uma das alterações que ocorrem com as organelas na etapa de maturação oocitária. Observamos que os grupos tratados com 4mg/mL OVA (54,21%) e 6 mg/mL OVA (47,65%) foram semelhantes ($p>0,05$) ao grupo controle tratado com 10% SFB (53,75%). Por outro lado, a porcentagem de oócitos com GC na periferia no grupo tratado com 2mg/mL OVA (20,15%) foi inferior ($p<0,05$) aos demais grupos (Tabela 6, Figuras 7 e 8).

Tabela 6. Valores médios ($\% \pm dp$) de oócitos bovinos apresentando GC periféricos, como índice de maturação citoplasmática, após cultivo de maturação por 24h, em meios suplementados com 10% SFB (CONT), ou diferentes concentrações de OVA: 2 (OVA 2), 4 (OVA 4) ou 6mg/mL (OVA 6).

| Grupos | Nº de oócitos | GC periféricos (médias $\% \pm dp$) |
|--------|---------------|--------------------------------------|
| CONT | 180 | 53,75 \pm 1,77 ^a |
| OVA 2 | 159 | 20,15 \pm 2,31 ^b |
| OVA 4 | 167 | 54,21 \pm 5,04 ^a |
| OVA 6 | 170 | 47,65 \pm 4,16 ^a |

^{a,b} Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si ($p>0,05$).

F = 40,71**, CV = 8,14%.

** = Significativo ($p<0,01$),

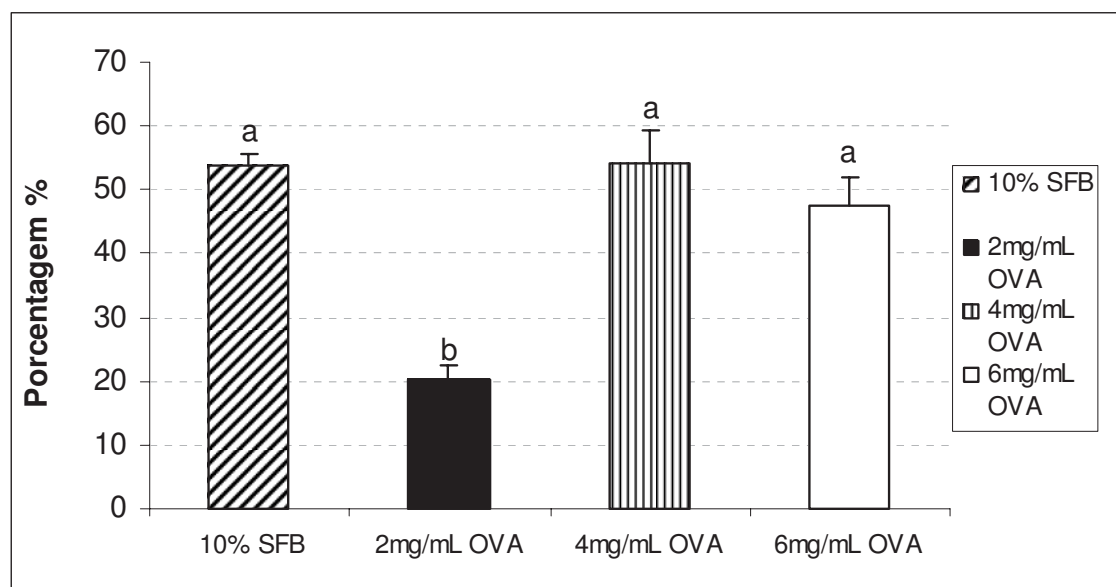


Figura 8. Representação gráfica da porcentagem média e do desvio padrão de oócitos com grânulos corticais na periferia, como índice de maturação citoplasmática, após 24h de maturação *in vitro*, em meios suplementados com 10% SFB, ou 2, ou 4 ou 6mg/mL de OVA.

A MIV de oócitos é uma importante etapa na produção *in vitro* de embriões (PIV), pois os oócitos maduros depois de fecundados devem sustentar o desenvolvimento embrionário e fetal, resultando em indivíduos saudáveis (DIELEMAN et al., 2002).

A utilização de ovalbumina, na concentração de 2 mg/mL, mostrou-se menos eficiente na maturação nuclear e na migração de grânulos corticais em oócitos bovinos, quando comparada às concentrações 4 e 6 mg/mL de OVA e ao grupo controle (10% SFB).

Durante o processo de maturação oocitária ocorrem alterações nucleares (reorganização da rede de microtúbulos, ruptura do envoltório nuclear, condensação dos cromossomos e progressão da meiose para metáfase I, anáfase I, telófase I, expulsão do primeiro corpúsculo polar e retenção no estágio de metáfase II) (CHA e CHIAN, 1998). De acordo com Dode e Adona (2001), os

oócitos que atingem o crescimento total completam a maturação nuclear, mesmo na ausência de substâncias estimuladoras. Com isso, ações para modificar o programa molecular do oócito devem acontecer antes do rompimento da vesícula germinativa (GVBD) (DODE e GRAVES, 2003).

Ainda durante a maturação, ocorre uma série de alterações citoplasmáticas, como desenvolvimento do estoque de lipídeos, redução do complexo de Golgi, redistribuição de ribossomos, rearranjo das mitocôndrias, e alinhamento dos grânulos corticais próximo à membrana plasmática (HYTTELL et al., 1997).

A concentração 8mg/mL de ovalbumina (OVA), em meio SOF durante a etapa de MIV, foi utilizada por Ali e Sirard (2002) propiciando subsequente desenvolvimento embrionário. Ainda segundo os mesmos autores, as concentrações 1, 8 ou 20mg/mL não diferiram significativamente nas taxas de clivagem e de produção de mórulas e blastocistos.

A partir desses resultados de maturação nuclear e migração de grânulos corticais (Tabelas 5 e 6, Figuras 5 a 8), constatamos que a ovalbumina (OVA) nas concentrações 4 e 6 mg/mL promoveram taxas similares entre si, e ao grupo controle (10% SFB), tanto na maturação nuclear, como na migração dos grânulos corticais para a periferia do oócito. Portanto, sob as condições desse estudo, a menor concentração eficiente de ovalbumina a ser utilizada na etapa de MIV foi a de 4mg/mL.

6.2. Experimento II: Avaliação da influência da ovalbumina como suplemento protéico na maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

Para avaliação da maturação oocitária sob diferentes suplementos protéicos, foram utilizados 1505 oócitos, distribuídos nos quatro grupos experimentais em quatro repetições (334-450 oócitos por tratamento). No total de oócitos avaliados, 1140 (75,74%) atingiram o estágio de metáfase II e 955 oócitos (63,45%) apresentaram GC dispostos na periferia da membrana citoplasmática.

As taxas de maturação nuclear para os diferentes tratamentos estão descritas na Tabela 7 e demonstradas na Figura 9. Observamos que os grupos tratados com diferentes fontes protéicas, 4mg/mL BSA (74,01%), 4mg/mL OVA (78,78%), e 2mg/mL BSA + 2mg/mL OVA (73,92%), foram semelhantes ($p > 0,05$) ao grupo controle tratado com 10% SFB (75,66%).

Tabela 7. Valores médios ($\% \pm dp$) de maturação nuclear (oócitos em metáfase II) após cultivo de maturação por 24h, em meios suplementados com 10% SFB (SFB), ou 4mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), ou 4mg/mL de ovalbumina (OVA), ou 2mg/mL BSA + 2mg/mL OVA (BO).

| Grupos | Nº de oócitos | Maturação nuclear (médias $\% \pm dp$) |
|--------|---------------|---|
| SFB | 384 | 75,66 \pm 2,88 ^a |
| BSA | 450 | 74,01 \pm 4,41 ^a |
| OVA | 334 | 78,78 \pm 4,32 ^a |
| BO | 337 | 73,92 \pm 2,93 ^a |

^a Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si ($p > 0,05$).

F = 1,50^{NS}, CV = 4,90%

NS = Não significativo ($p > 0,05$)

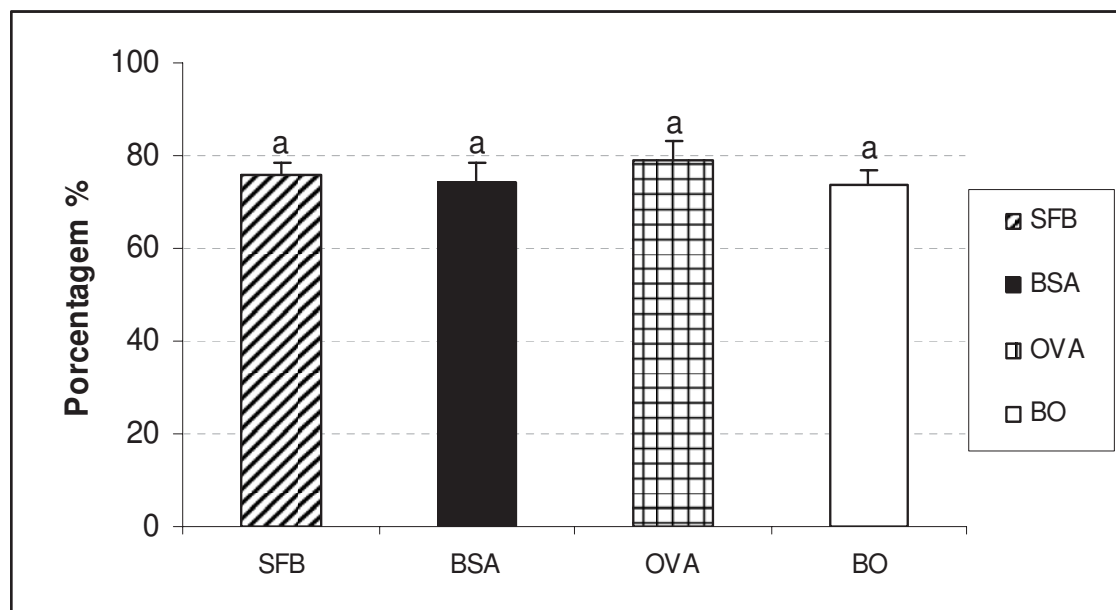


Figura 9. Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de oócitos em metáfase II, após 24h de maturação *in vitro*, em meios suplementados com 10% SFB, ou 4mg/mL de BSA, ou 4mg/mL de OVA, ou 2mg/mL de BSA + 2mg/mL de OVA (BO).

Em relação à migração dos grânulos corticais (Tabela 8, Figura 10), utilizada como índice de maturação citoplasmática, observamos que os grupos tratados com diferentes fontes protéicas, 4mg/mL BSA (58,89%), 4mg/mL OVA (65,48%), e 2mg/mL BSA + 2mg/mL OVA (66,76%), foram semelhantes ($p > 0,05$) ao grupo controle tratado com 10% SFB (64,35%).

Tabela 8. Valores médios ($\% \pm dp$) de oócitos bovinos apresentando GC periféricos, como indício de maturação citoplasmática, após cultivo de maturação por 24h, em meios suplementados com 10% SFB (SFB), ou 4mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), ou 4mg/mL de ovalbumina (OVA), ou 2mg/mL BSA + 2mg/mL OVA (BO).

| Grupos | Nº de oócitos | GC periféricos (médias $\% \pm dp$) |
|--------|---------------|--------------------------------------|
| SFB | 384 | 64,35 \pm 5,56 ^a |
| BSA | 450 | 58,89 \pm 2,88 ^a |
| OVA | 334 | 65,48 \pm 11,50 ^a |
| BO | 337 | 66,76 \pm 4,58 ^a |

^a Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si ($p > 0,05$).

F = 1,00^{NS}, CV = 10,87%

NS = Não significativo ($p > 0,05$).

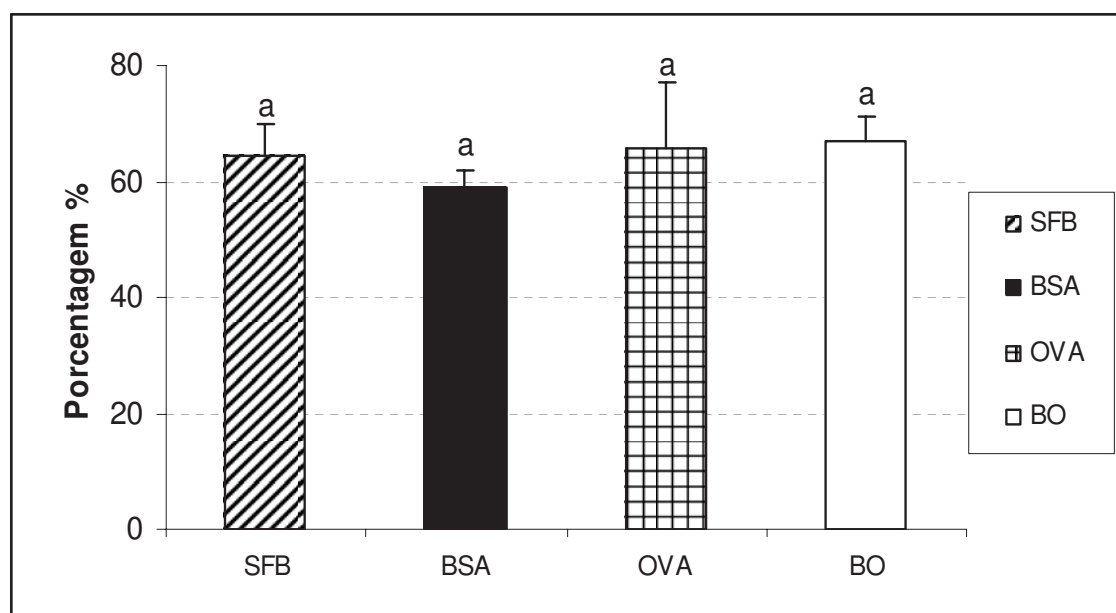


Figura 10. Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de oócitos com grânulos corticais na periferia, como indício de maturação citoplasmática, após 24h de maturação *in vitro*, em meios suplementados com 10% SFB, ou 4mg/mL de BSA, ou 4mg/mL de OVA, ou 2mg/mL de BSA + 2mg/mL de OVA (BO).

A partir dos resultados de maturação nuclear e migração de grânulos corticais (indício de maturação citoplasmática) (Tabelas 7 e 8, Figuras 9 e 10), constatamos que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as diferentes fontes protéicas (SFB, BSA, OVA e BO) com relação à maturação nuclear (quantidade de oócitos em estágio de metáfase II (MII)), e à migração dos grânulos corticais para a periferia do oócito.

O SFB e BSA são as fontes protéicas de origem animal mais utilizadas na suplementação do meio de maturação *in vitro* (MIV), e são responsáveis pelo incremento na taxa de maturação oocitária e eficiência produtiva (ALI e SIRARD, 2002).

Além das características morfológicas dos oócitos, as condições de cultivo também afetam a etapa de MIV. Hormônios, substâncias antioxidantes, fatores de crescimento, temperatura, atmosfera gasosa, tipo de suplemento protéico, densidade, entre outros, são alguns dos fatores que influenciam a eficiência da maturação oocitária *in vitro* (WATSON et al., 2000; DODE e GRAVES, 2003; DALVIT et al., 2005). A maturação se finaliza com a aquisição, pelo oócito, da capacidade de ser fecundado e desenvolver-se em embrião (LEAL e ADONA, 2006).

A maturação nuclear, nos diferentes grupos, variou de 73,92 a 78,78%, e foi semelhante à obtida por outros autores, de aproximadamente 80% em meio indefinido (KIM et al., 1997; MÉO NICIURA, 2005). Entretanto, os resultados de migração dos grânulos corticais, variaram de 58,89 a 66,76% (oócitos com GC periféricos), e foram inferiores aos descritos por MÉO NICIURA (2005), de 67,2 a 79,3%. Dessa maneira, podemos afirmar, que nessas condições de cultivo, as diferentes fontes protéicas utilizadas não afetaram a maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

Os oócitos maturados *in vitro*, comparados aos oócitos maturados *in vivo*, apresentam menores taxas de desenvolvimento embrionário após a FIV e o CIV (TAKAGI, 2001; RIZOS et al., 2003). Dessa maneira pode-se inferir que a maturação nuclear, citoplasmática e molecular, são incompletas.

Dessa maneira, podemos inferir que, nessas condições de cultivo durante etapa de MIV, as diferentes fontes protéicas utilizadas não limitaram as taxas de maturação *in vitro*, e que até mesmo o tratamento com duas fontes protéicas distintas, o grupo BO (composto por BSA e OVA), resultou em taxas similares de maturação oocitária.

6.3. Experimento III: Avaliação da influência da ovalbumina como suplemento protéico na fecundação *in vitro*.

Para avaliação das taxas de formação de pronúcleos sob diferentes suplementos protéicos, foram utilizados 508 prováveis zigotos, distribuídos nos seis grupos experimentais em quatro repetições (79-90 prováveis zigotos por tratamento). No total dos prováveis zigotos avaliados, 285 (56,10%) apresentaram dois pronúcleos, 159 (31,30%) não apresentaram nenhum pronúcleo, 26 (5,12%) apresentaram 1 PN e 38 (7,48%) apresentaram mais de 2 pronúcleos.

As taxas de formação de pronúcleos para os diferentes tratamentos estão descritas nas Tabelas 9 e 10, e demonstradas nas Figuras 11 e 12. Observamos que o grupo SO (76,67% de 2 PN) foi semelhante ($p > 0,05$) ao grupo CONT (82,95% de 2 PN). Por outro lado, as taxas de formação de dois pronúcleos dos demais grupos, BB (56,98%), BO (39,02%), OB (37,36%) e OO (39,24%), diferiram ($p < 0,05$) do grupo controle (82,95% de 2 PN).

Tabela 9. Valores médios (número total e %) da formação de pronúcleos com 18 a 20 h após início da fecundação, em seis tratamentos: controle (CONT), SFB e OVA (SO), BSA e BSA (BB), BSA e OVA (BO), OVA e BSA (OB), e OVA e OVA (OO).

| Grupos | Nº prov Z | 0PN | 1PN | 2PN | +2PN |
|--------|-----------|-------------|------------|-------------|------------|
| CONT | 88 | 7 (7,95%) | 2 (2,28%) | 73 (82,95%) | 6 (6,82%) |
| SO | 90 | 9 (10%) | 8 (8,89%) | 69 (76,67%) | 4 (4,44%) |
| BB | 86 | 28 (32,56%) | 4 (4,65%) | 49 (56,98%) | 5 (5,81%) |
| BO | 82 | 37 (45,12%) | 1 (1,23%) | 32(39,02%) | 12(14,63%) |
| OB | 83 | 38 (45,78%) | 9 (10,84%) | 31 (37,36%) | 5 (6,02%) |
| OO | 79 | 40 (50,63%) | 2 (2,54%) | 31 (39,24%) | 6 (7,59%) |

Nº prov Z = número de prováveis zigotos

Tabela 10. Valores do qui-quadrado nas comparações entre grupo controle (CONT) com todos os demais tratamentos: SFB e OVA (SO), BSA e BSA (BB), BSA e OVA (BO), OVA e BSA (OB), e OVA e OVA (OO).

| Grupo vs Grupo | χ^2 |
|----------------|----------------------|
| SO CONT | 0,2269 ^{NS} |
| BB CONT | 0,0004* |
| BO CONT | 0,0001* |
| OB CONT | 0,0001* |
| OO CONT | 0,0001* |

NS = Não significativo (p>0,05)

* = Significativo (p<0,01)

χ^2 = Qui-Quadrado

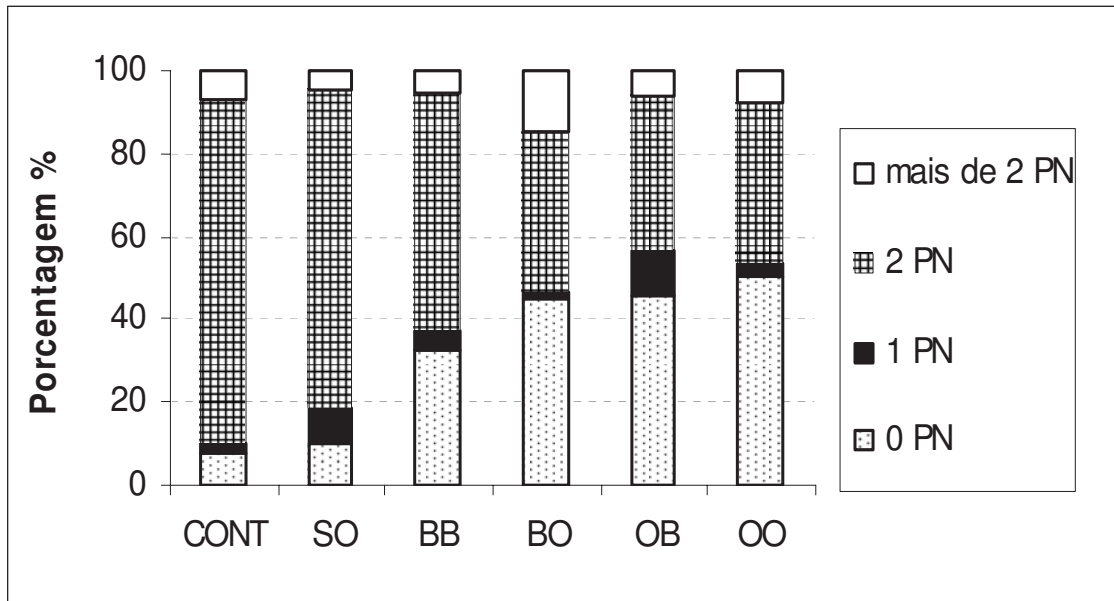


Figura 11. Representação gráfica da porcentagem média de zigotos segundo o estágio pronuclear após 18 a 20 horas do início da fecundação *in vitro* (FIV), em meio TALP-FIV suplementado com BSA ou OVA.

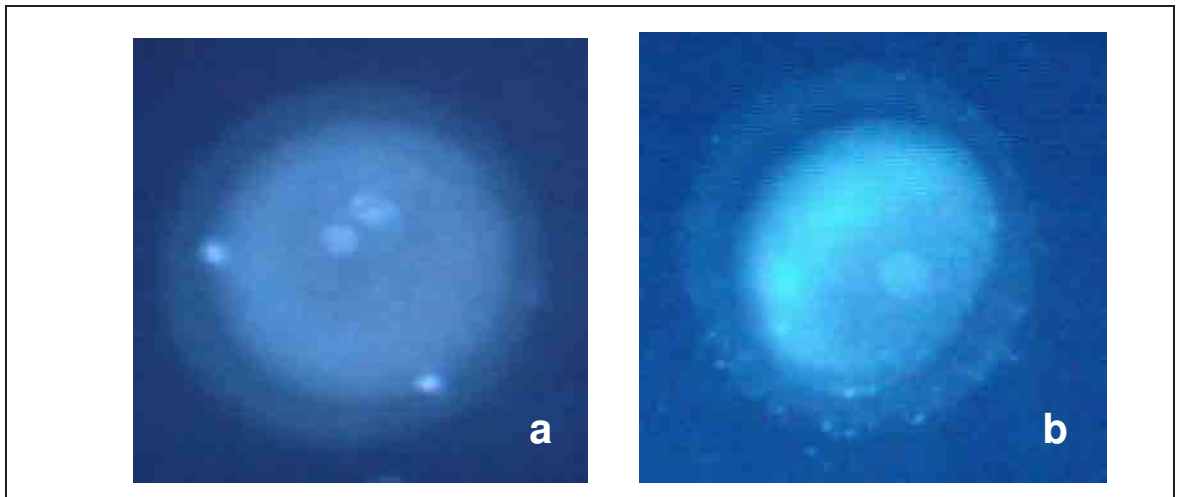


Figura 12. Aspecto morfológico do estágio pronuclear em zigotos coletados após 18 a 20 horas do início da fecundação *in vitro* (FIV). (a) Zigoto com 2 pronúcleos (PN); (b) zigoto com 1 PN. DNA corado com 10 μ g/mL de Hoechst 33342 por 20 min.

O êxito da fecundação *in vitro* em bovinos requer preparação apropriada tanto para o sêmen, quanto para o oócito, bem como condições que favoreçam a atividade metabólica dos gametas masculino e feminino (BRACKETT et al., 1981). De acordo com Méo Niciura (2005), a presença de 2 pronúcleos de tamanhos diferentes (masculino maior que o feminino), avaliada por coloração, predominou às 14 e 18 horas pós inseminação (hpi), embora tenham aparecido, pela primeira vez, às 12 hpi. Por outro lado, de acordo com Saeki et al (1991) e Lim et al. (1999c), a formação de PN ocorreu 7 hpi, e 8 hpi, respectivamente, provavelmente devido às diferenças nos protocolos utilizados na etapa de FIV.

Os resultados referentes às taxas de formação de um pronúcleo, entre 1,23 a 10,84%, nos momentos de 18 a 20 hpi corroboram com os descritos por Méo Niciura (2005), onde mesmo nos momentos em que houve predominância de 2 PN de tamanhos diferentes, foram encontrados zigotos com 1 PN (16,7 a 28,6%). Ainda, de acordo com a mesma autora, o melhor momento para a diferenciação entre os pronúcleos masculino e feminino ocorreu entre 14 e 18 horas após a inseminação (hpi), enquanto a singamia (união dos pronúcleos masculino e feminino) em zigotos bovinos, aconteceu em maior frequência após 24 h de fecundação *in vitro*.

Como foram observados zigotos com 1 pronúcleo (PN) em momentos com predominância de 2 PN, pode se supor que alguns zigotos apresentaram singamia e desenvolvimento mais rápidos, e provavelmente, até possuem maior potencial para atingirem o estágio de blastocisto (MEIRELLES et al., 2004). Por outro lado, esses embriões podem ter sofrido ativação partenogenética, e dessa forma não são passíveis de se desenvolverem a termo.

Bavister et al. (2003) reportam que a albumina sérica de várias espécies diferentes é capaz de proporcionar capacitação espermática efetiva e ainda, a capacidade de fecundação em outras espécies. Sendo assim, não é considerada espécie específica, pois é efetiva para diferentes espécies. Por exemplo, albuminas séricas de hamsters, humanos e bovinos podem suportar a etapa de fecundação em hamsters.

Esses resultados são importantes para avaliação da eficiência das fontes protéicas utilizadas nas etapas de MIV e FIV, e suas interações e combinações, pois os tratamentos com as maiores taxas de formação de 2 PN, grupos Controle e SO, foram superiores aos demais tratamentos na formação de pronúcleos. Os dois tratamentos mais eficientes, nessas condições, possuem fonte protéica em comum na etapa de MIV, o SFB. Isto deixa claro que a capacidade do zigoto em formar os pronúcleos é dependente da qualidade da maturação oocitária. Neste caso, o SFB mostrou ser mais eficiente do que as fontes protéicas BSA e OVA. No entanto, o tratamento com OVA foi capaz de induzir a capacitação e reação acrossomal, viabilizando a fecundação e formação dos pronúcleos em condições similares ao do BSA, porém quando a maturação foi obtida com a suplementação de SFB.

Para os oócitos submetidos às etapas de maturação e fecundação em meio suplementado com BSA, a formação dos pronúcleos foi mais eficiente do que quando a maturação se deu com BSA e fecundação com OVA. Por outro lado, onde a MIV foi realizada com suplementação de OVA e fecundação em BSA ou OVA, os resultados foram numericamente similares e inferiores, respectivamente, a BO. Podemos inferir que a formação dos pronúcleos após a etapa de fecundação é diretamente dependente da etapa de maturação.

6.4. Experimento IV: Avaliação dos efeitos da ovalbumina nas etapas de maturação, fecundação e cultivo e suas conseqüências no desenvolvimento embrionário *in vitro*.

No experimento IV foram avaliados os efeitos da ovalbumina nas etapas de MIV, FIV e CIV, e suas conseqüências no desenvolvimento embrionário *in vitro*, tanto quanto a produção embrionária quantitativa (taxa de clivagem, produção de blastocistos e eclosão), como qualitativa (quantidade celular diferenciada de MCI, TF, e número total de células).

Foram avaliadas as taxas de clivagem, de produção de blastocistos e de eclosão dos embriões, sob diferentes fontes protéicas e combinações entre as etapas de MIV, FIV e CIV. E também foi avaliada a qualidade embrionária pela verificação do número de células da MCI, do TF, e número total de células, dos blastocistos produzidos sob diferentes fontes protéicas e combinações entre as etapas de MIV, FIV e CIV.

6.4.1. Quantificação das taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário e de eclosão dos embriões CIV.

Para avaliação quantitativa, foram utilizados 2355 oócitos bovinos distribuídos entre sete grupos experimentais: CONT, SBS, SOS, BBB, BOB, OOO ou OBO (Tabela 7), em cinco repetições (314-352 oócitos por tratamento). No total dos oócitos avaliados, 1795 (76,22%) clivaram, 646 (27,43% do total de oócitos ou 35,99% do total de clivados) tornaram-se blastocistos e 243 (10,32% do total de oócitos, 13,54% do total de clivados, ou 37,62% do total de blastocistos) eclodiram.

As taxas de clivagem, produção de blastocistos e eclosão para os diferentes tratamentos estão descritas nas Tabelas 11, 12 e 13 e demonstradas nas Figuras 13 a 16.

Tabela 11. Valores médios (% \pm dp) da taxa de clivagem após maturação, fecundação e início de desenvolvimento em meios suplementados com SFB ou BSA ou OVA.

| Tratamentos | Nº de oócitos | Variável |
|-------------|---------------|---|
| | | Tx Clivagem (média, %, \pm DP) (Clivados/oócitos) |
| CONT | 352 | 294,98 (83,8%) \pm 11,98 ^a |
| SBS | 340 | 276,76 (81,4%) \pm 12,88 ^a |
| SOS | 314 | 236,76 (75,4%) \pm 7,92 ^a |
| BBB | 341 | 261,89 (76,8%) \pm 7,12 ^a |
| BOB | 343 | 254,51 (74,2%) \pm 8,76 ^a |
| OOO | 340 | 227,12 (66,8%) \pm 10,92 ^a |
| OBO | 325 | 232,70 (71,6%) \pm 2,31 ^a |

^{a,b,c,d} Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si ($p > 0,05$).

F = 1,85^{NS}, CV = 12,47%

NS = Não significativo ($p > 0,05$)

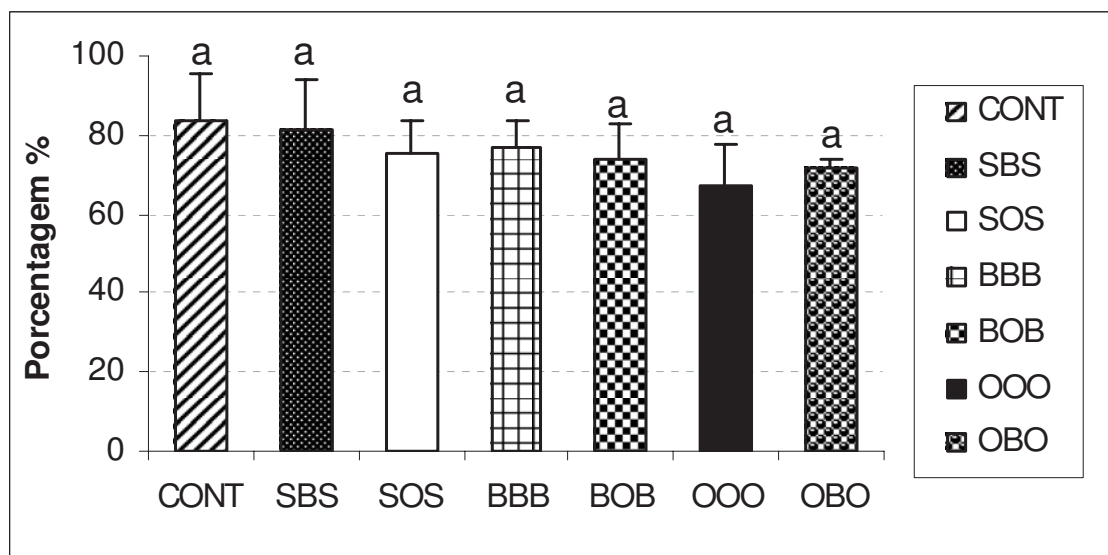


Figura 13. Representação gráfica da quantificação das taxas de clivagem sob diferentes suplementos protéicos nas etapas de MIV, FIV e CIV.

Tabela 12. Valores médios (% \pm dp) da taxa de produção de blastocistos após maturação, fecundação e cultivo de desenvolvimento em meios suplementados com SFB ou BSA ou OVA.

| Tratamentos | Nº de oócitos | Variáveis | |
|-------------|---------------|---|----------|
| | | Tx Blastocistos (média, %, \pm DP) (BIs/clivados) | BI/Total |
| CONT | 352 | 132,74 (45,0%) \pm 11,23 ^a | 37,5% |
| SBS | 340 | 118,45 (42,8%) \pm 8,41 ^a | 34,7% |
| SOS | 314 | 80,02 (33,8%) \pm 5,02 ^{ab} | 25,4% |
| BBB | 341 | 93,76 (35,8) \pm 6,26 ^{ab} | 27,3% |
| BOB | 343 | 81,44 (32,0) \pm 4,69 ^{ab} | 23,6% |
| OOO | 340 | 59,05 (26,0) \pm 4,42 ^b | 17,3% |
| OBO | 325 | 76,79 (33,0) \pm 8,63 ^{ab} | 23,4% |

^{a,b,c,d} Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si ($p > 0,05$).

F = 3,95, CV = 20,68%

* = Significativo ($p < 0,05$)

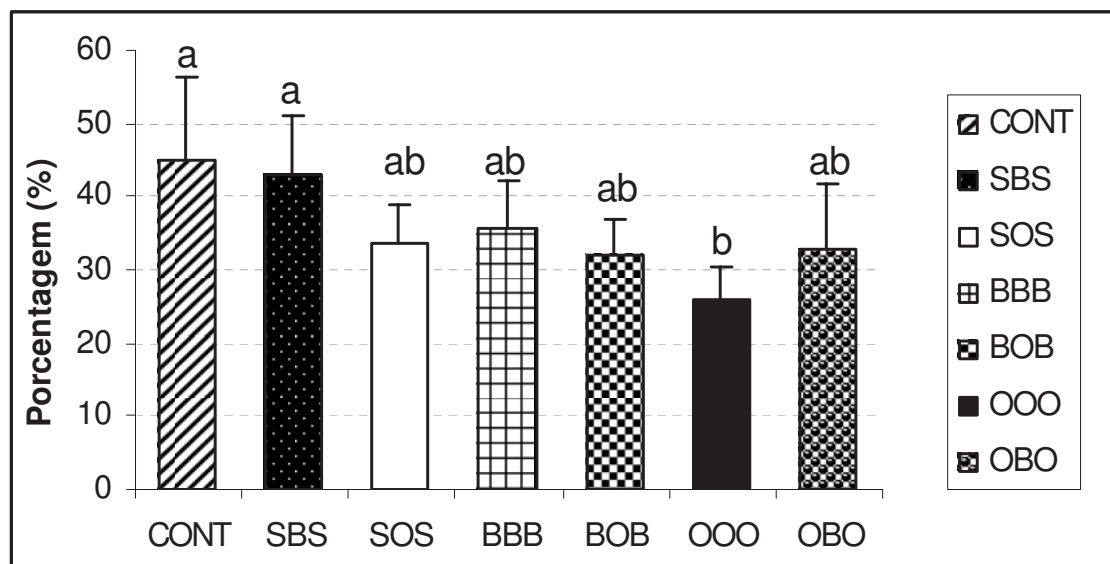


Figura 14. Representação gráfica da quantificação das taxas de produção de blastocistos sob diferentes suplementos protéicos nas etapas de MIV, FIV e CIV.

Tabela 13. Valores médios (% \pm dp) da taxa de eclosão de blastocistos após maturação, fecundação e cultivo de desenvolvimento em meios suplementados com SFB ou BSA ou OVA.

| Tratamentos | Nº de oócitos | Variáveis | |
|-------------|---------------|---|---------------|
| | | Tx Eclosão (média, %, \pm DP) (Eclodidos/BIs) | Eclosão/Total |
| CONT | 352 | 61,32 (46,2%) \pm 6,76 ^a | 17,3% |
| SBS | 340 | 51,41 (43,4%) \pm 11,89 ^{ab} | 15,0% |
| SOS | 314 | 30,73 (38,4%) \pm 8,29 ^{abc} | 9,5% |
| BBB | 341 | 39,01 (41,6%) \pm 9,29 ^{abc} | 11,4% |
| BOB | 343 | 22,97 (28,2%) \pm 7,12 ^{bcd} | 6,7% |
| OOO | 340 | 12,05 (20,4%) \pm 8,32 ^d | 3,5% |
| OBO | 325 | 19,50 (25,4%) \pm 5,59 ^{cd} | 5,8% |

^{a,b,c,d} Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si ($p > 0,05$).

F = 7,12^{*}, CV = 24,12%

** = Significativo ($p < 0,01$).

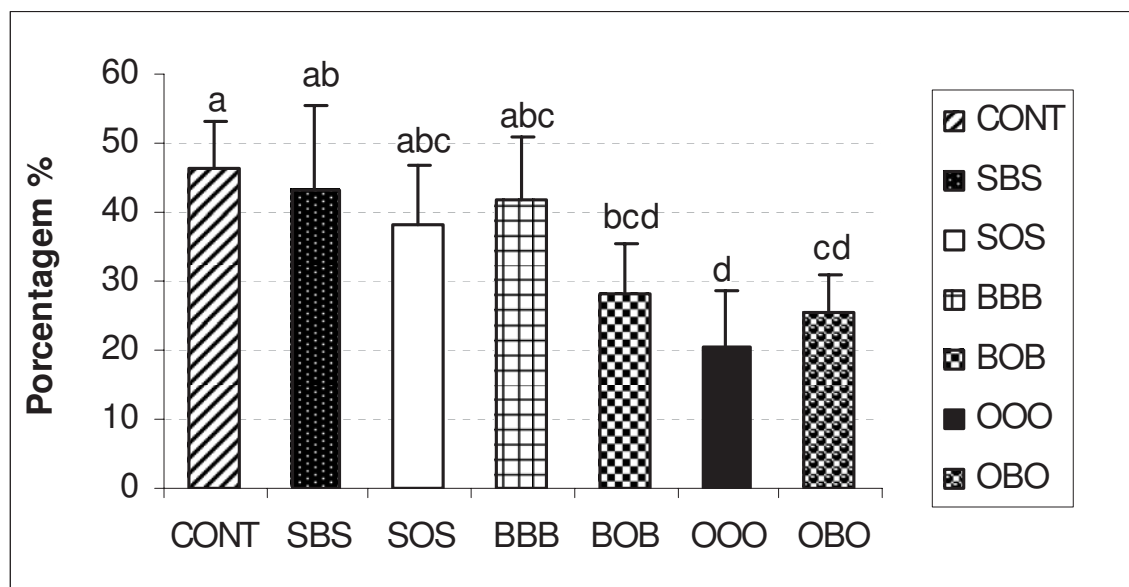


Figura 15. Representação gráfica da quantificação das taxas de eclosão dos blastocistos, sob diferentes suplementos protéicos nas etapas de MIV, FIV e CIV.

Observamos que os diferentes tratamentos (CONT, SBS, SOS, BBB, BOB, OOO, OBO) foram semelhantes ($p > 0,05$) quanto à taxa de clivagem. Entretanto, quanto à taxa de produção de blastocistos, o grupo OOO (26,0%) foi semelhante ($p > 0,05$) aos grupos SOS (33,8%), BBB (35,8%), BOB (32%), e OBO (33%), e por outro lado, foi inferior ($p < 0,05$) aos grupos CONT (45%) e SBS (42,8%). Quanto à taxa de eclosão, o grupo OOO (20,4%) foi inferior ($p < 0,05$) aos grupos CONT (46,2%), SBS (43,4%), SOS (38,4%), BBB (41,6%), e semelhante ($p > 0,05$) aos grupos BOB (28,2%) e OBO (25,4%).

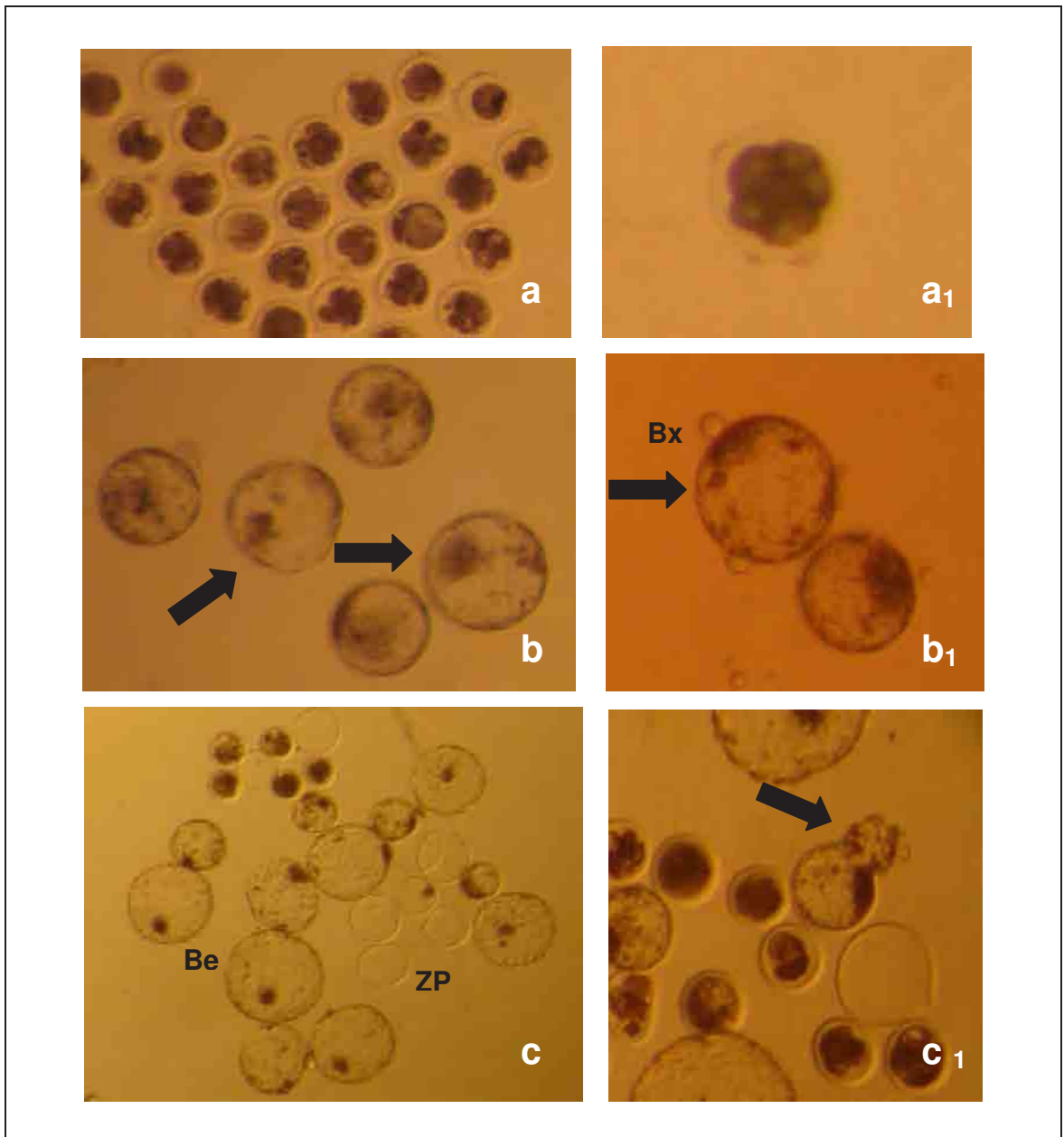


Figura 16. Aspecto morfológico de embriões bovinos. (a) Embriões clivados nos estádios de 4 a 8 células. (a₁) Embrião de 8 células. (b) e (b₁) Blastocistos em D7 e BIs expandidos (Setas). (c) Blastocistos eclodidos (Be) e presença das zonas pelúcidas (ZP) próximas, em D8 e D9. (c₁) Blastocisto em eclosão (Seta).

Ocorrem variações na produção de blastocistos entre laboratórios em função das inúmeras diferenças em procedimentos que são adotados, bem como protocolos, procedimentos e substâncias utilizadas (GORDON, 1994). Os oócitos provenientes de abatedouros, utilizados nos experimentos para a produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos, apresentam qualidade e competência heterogêneas, resultando em diferentes taxas de clivagem, taxas de produção de blastocistos e taxas de eclosão. Há inúmeras diferenças nos oócitos provenientes de acordo com a idade da fêmea abatida (PONDERATO et al., 2002), estação do ano e condições nutricionais, bem como escore de condição corporal (BOLAND et al., 2001), estágio do ciclo estral e condição reprodutiva (CHOHAN e HUNTER, 2003).

Variações entre épocas do ano, momentos de colheita do material e nos procedimentos foram minimizados com a distribuição aleatória dos oócitos originários do mesmo dia do procedimento, os quais foram selecionados e divididos entre todos os tratamentos, procurando desta forma diminuir os efeitos da origem e variações diárias.

A taxa de clivagem média dos tratamentos variou entre 66,8% a 83,8%, utilizando o mesmo sêmen, na etapa de fecundação, para todos os tratamentos. Embora não significativa ($p > 0,05$), é importante ressaltar que as maiores taxas de clivagem (81,4 e 83,8%) ocorreram nos tratamentos CONT e SBS, onde a maturação *in vitro* (MIV) foi realizada com a suplementação com SFB, fecundação em BSA e cultivo de desenvolvimento somente com as fontes SFB ou SFB e BSA. No entanto, nos tratamentos BBB e BOB, quando a MIV foi realizada com a suplementação com BSA, e a fecundação em BSA ou OVA, e cultivo de desenvolvimento em BSA, resultaram em valores intermediários (74,2 e 76,8%), e as taxas mais baixas de clivagem (66,8 e 71,6%) foram verificadas nos tratamentos onde a MIV foi realizada com a suplementação com OVA, FIV com BSA ou OVA, e cultivo de desenvolvimento em OVA.

Os resultados obtidos estão de acordo com Pinyopummintr e Bavister (1994), que obtiveram taxas de clivagem semelhantes em oócitos maturados e fecundados *in vitro* em meios de cultura simples (semidefinido ou indefinido) ou quimicamente definido (na ausência de suplementação protéica), e também estão de acordo com os resultados obtidos por Soria (2005), onde os sistemas de cultivo embrionário quimicamente definidos utilizando as macromoléculas sintéticas (PVA ou PVP), bem como sistemas de cultivo embrionário orgânicos, suplementados com diferentes fontes protéicas (BSA ou SFB), não apresentaram diferenças estatísticas em relação à taxa de clivagem.

Pode haver clivagem de oócitos maturados e fecundados *in vitro* em meios de cultura simples (semidefinido ou indefinido) ou quimicamente definido (na ausência de suplementação protéica), entretanto para o desenvolvimento ideal de blastocistos, o SFB é requerido (PINYOPUMMINTR e BAVISTER, 1994).

A produção de blastocistos e a capacidade destes em eclodir foram influenciados pelas fontes protéicas utilizadas nas etapas de maturação, fecundação e cultivo de desenvolvimento *in vitro*. O SFB como fonte protéica na MIV proporcionou os melhores resultados de produção e eclosão dos blastocistos (Tabelas 12 e 13 e Figuras 14 e 15). O BSA, como fonte protéica nas etapas de fecundação e cultivo de desenvolvimento embrionário, refletiu diretamente nas taxas de produção e eclosão dos blastocistos. No entanto, a OVA quando utilizada nas três etapas (MIV, FIV e CIV), apresentou os menores desempenhos nas taxas de produção de blastocistos e nas taxas de eclosão.

Oócitos cultivados em meios de maturação contendo diferentes concentrações de BSA, Fração V (1, 8 ou 20mg/mL) resultaram em taxas de clivagem semelhantes, no entanto o tratamento com ausência de BSA, em meio SOF, durante a etapa de MIV, resultou em maior produção de mórulas e blastocistos, e as demais concentrações de BSA não diferiram entre si. Já os oócitos maturados em ausência de fonte protéica, e diferentes fontes (BSA-V, BSA purificado, BSA-FAF, ovalbumina, ou SFB) foram avaliados até a etapa de CIV, onde a presença de BSA-V e SFB significativamente diminuíram a

porcentagem de mórulas e blastocistos, enquanto as demais fontes protéicas apresentaram maiores taxas de produção de mórulas e blastocistos (ALI e SIRARD, 2002).

Quando o BSA-V foi substituído na etapa de MIV por BSA, BSA-FAF e OVA, a taxa de desenvolvimento embrionário aumentou. Moléculas de baixo peso molecular podem agir como contaminantes durante a preparação do BSA-V, e atuar negativamente quando adicionado ao meio de MIV (ALI e SIRARD, 2002). Em hamsters, diferentes preparações de BSA causam efeitos variados no desenvolvimento, aumentando ou diminuindo, estimulando ou inibindo (BAVISTER, 1995).

Garcia (2004) observou que a suplementação com BSA na etapa de CIV originaram maiores ($p < 0,01$) taxas de clivagem, produção de blastocistos (taxa calculada em relação ao número de oócitos totais) e eclosão (taxa calculada em relação ao número de blastocistos), sendo de 93,5%, 32,3% e 77,1%, em comparação à suplementação com SFB, as quais foram: 84,0%, 26,7% e 38,7%, respectivamente. Entretanto, Lonergan et al. (1998) observou que o SFB acelerou significativamente o desenvolvimento embrionário, promovendo blastulação prematura e aumentando a porcentagem total de blastocistos com maior número de células totais e taxa de eclosão.

De acordo com Lonergan et al. (1999), as diferentes composições dos meios de cultivo, assim como as variações da qualidade espermática, também exercem impactos significativos sobre a produção de embriões, por interferir diretamente na FIV e no CIV de embriões.

Embora os meios definidos sejam modelos ideais para se estudar as exigências exatas dos oócitos e embriões em cultivo *in vitro*, e analisar a ação física de variadas substâncias, e ainda também úteis na prevenção de contaminações por patógenos (GANDHI et al., 2000), a suplementação dos meios de cultura com fontes protéicas de origem animal têm apresentado os melhores resultados desde a maturação oocitária até a etapa final de desenvolvimento *in vitro* de embriões (VANROOSE et al., 2001). De acordo com Soria (2005), as

taxas de eclosão de embriões bovinos não apresentaram diferenças em relação ao controle e aos tratamentos aos quais foram submetidos, entretanto, em valores absolutos, a eclosão em meios sintéticos (PVA e PVP) foi inferior em relação aos meios orgânicos (SFB e BSA).

Segundo Bavister et al. (2003), há moléculas contaminantes presentes em diferentes preparações de albuminas comerciais, o que causa variações das atividades biológicas, e resultados oscilatórios nas taxas de produção de embriões de diferentes espécies. Ainda sugere que é inexplicável o fato de que essas diferentes albuminas possuem a capacidade de suportar a capacitação e a fecundação *in vitro*, em virtude dos diferentes contaminantes, tipos e diferentes processos de purificação, cristalina versus BSA livre de ácidos graxos, ou até mesmo diferentes combinações comerciais.

De acordo com Carolan et al. (1995), a remoção do BSA no meio SOF padrão resultou em significativa redução de blastocistos produzidos nos Dias 6, 7 e 8, respectivamente (17 vs 8%; 28 vs 18%; 31 vs 21%; $P < 0,05$), mas a presença ou ausência de células do *cumulus* circundando os supostos zigotos no cultivo em SOF não promoveram diferença na taxa de clivagem, na porcentagem de embriões de 5 a 8 células ou na produção de blastocistos (Dia 6, 7 ou 8). No entanto, a suplementação com SFB na etapa de CIV reduziram as taxas de produção de blastocistos e a qualidade dos mesmos, pois houve diminuição do número de núcleos e redução da taxa de eclosão em comparação à suplementação com o BSA (GARCIA, 2004).

Diferentes sistemas de cultivo *in vitro* que sustentam o desenvolvimento embrionário podem ser classificados em função da presença ou da ausência de fontes protéicas. Os meios considerados indefinidos contam com a presença de SFB, devido à presença de hormônios, fatores de crescimento e outras substâncias desconhecidas (HOLM et al., 2002), meios que contém o BSA como principal substituto protéico do SFB, são considerados meios semidefinidos, pelo fato de estar ligado a fatores embriotróficos, como proteínas, fatores de crescimento, substratos energéticos e outros contaminantes. Já os sistemas

definidos são aqueles constituídos por substâncias previamente conhecidas, como aminoácidos, macromoléculas, dentre elas PVA, PVP, fatores de crescimento e suplementos sintéticos (GORDON, 1994).

Foi demonstrado que em meios contendo SFB a eclosão é facilitada, isso ocorre devido a presença do plasminogênio, o qual o embrião o transforma em plasmina, de atividade proteolítica, e dessa forma auxilia na degradação da zona pelúcida, no momento da eclosão (KAAEKUAHIWI e MENINO, 1990).

A velocidade de formação dos blastocistos é maior em meio contendo SFB, em comparação aos meios com ausência de SFB na etapa de desenvolvimento embrionário (RIZOS et al., 2003).

Diversos estudos têm reportado que a suplementação prolongada com SFB nos meios de cultura provocam alterações morfológicas e efeitos deletérios diretos aos embriões, como densidade, coloração, tamanho, metabolismo e a expressão de inúmeros genes (SHAMSUDDIN e RODRIGUEZ, 1994; HALL, 1999; KRISHER et al., 1999), além de rupturas ultra-estruturais em organelas, como as mitocôndrias, entre outras alterações prejudiciais (HASLER, 2000; FARIN et al., 2001). Há também alterações metabólicas, como presença de maior quantidade de grânulos lipídicos em mórulas e blastocistos cultivados em meios suplementados com SFB, em comparação aos cultivados na ausência de suplementação (ABE et al., 1999).

6.4.2. Verificação da qualidade embrionária através do número de células da massa celular interna (MCI), do trofoblasto (TF), e número total de células (MCI + TF) nos embriões CIV.

Neste experimento foram utilizados 390 blastocistos, oriundos dos sete grupos experimentais: CONT, SBS, SOS, BBB, BOB, OOO ou OBO (Tabela 8), em três repetições (53-59 blastocistos por tratamento).

No sétimo dia de CIV, os embriões produzidos sob diferentes suplementos protéicos nas etapas de MIV, FIV e CIV, foram destinados à verificação da qualidade por meio da proporção entre o número de células da MCI, do TF e células totais.

As médias de células da MCI, TF e totais dos blastocistos avaliados oriundos dos diferentes tratamentos estão descritas na Tabela 12 e demonstradas nas Figuras 17, 18 e 19.

Observamos que a média de células da MCI dos blastocistos do grupo OOO (16,79) foi inferior ($p < 0,05$) aos demais grupos. Entretanto, a média de células do TF dos blastocistos do grupo OOO (38,25) foi semelhante ($p > 0,05$) aos grupos: BBB (45,74) e BOB (45,60), e foi inferior ($p < 0,05$) aos grupos: CONT (57,59), SBS (54,41), SOS (56,74) e OBO (47,35). A média total de células dos blastocistos do grupo OOO (56,04) foi inferior ($p < 0,05$) aos grupos CONT (84,86), SBS (78,96), SOS (81,32), BBB (68,11), BOB (69,55), e OBO (69,82).

Tabela 14. Valores médios \pm (dp) do número de células na MCI, TF e Totais nos embriões bovinos em D7, produzidos em meios suplementados com SFB, ou BSA, ou OVA durante as etapas de MIV, FIV e CIV, respectivamente.

| Tratamentos | Nº de BIs | média de células | | |
|-------------|-----------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | | MCI (média \pm dp) | TF (média \pm dp) | Totais (média \pm dp) |
| CONT | 58 | 27,27 \pm 8,09 ^a | 57,59 \pm 14,56 ^a | 84,86 \pm 17,08 ^a |
| SBS | 56 | 24,55 \pm 7,75 ^{ab} | 54,41 \pm 13,20 ^{ab} | 78,96 \pm 16,47 ^{ab} |
| SOS | 59 | 24,58 \pm 6,85 ^{ab} | 56,74 \pm 11,82 ^a | 81,32 \pm 14,94 ^a |
| BBB | 55 | 22,36 \pm 6,88 ^b | 45,74 \pm 12,64 ^{cd} | 68,11 \pm 14,82 ^c |
| BOB | 53 | 23,94 \pm 7,76 ^{ab} | 45,60 \pm 12,00 ^{cd} | 69,55 \pm 15,95 ^c |
| OOO | 53 | 16,79 \pm 5,00 ^c | 39,25 \pm 12,60 ^d | 56,04 \pm 16,03 ^d |
| OBO | 56 | 23,18 \pm 6,28 ^b | 47,35 \pm 12,77 ^{bc} | 69,82 \pm 15,95 ^{bc} |

^{a,b,c,d} Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si ($p > 0,05$).

F = 5,73** (MCI); F = 7,84** (TF); F = 10,24** (Totais). CV = 30,19% (MCI); CV = 26,17% (TF); CV = 22,16% (Totais).

** = $p < 0,01$

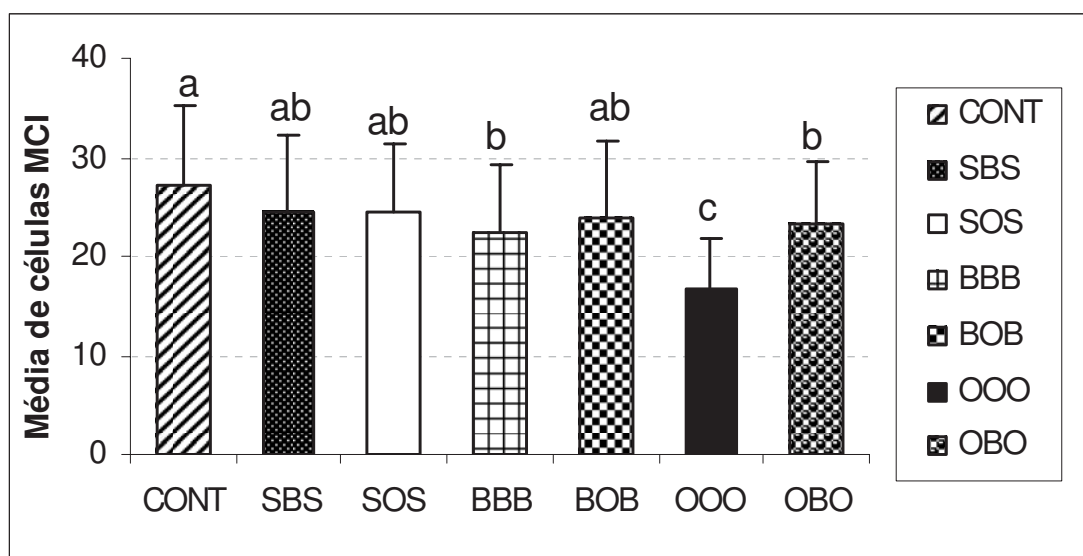


Figura 17. Representação gráfica da média do número de células da massa celular interna (MCI), nos blastocistos, sob diferentes suplementos proteicos nas etapas de MIV, FIV e CIV de produção *in vitro* de embriões bovinos.

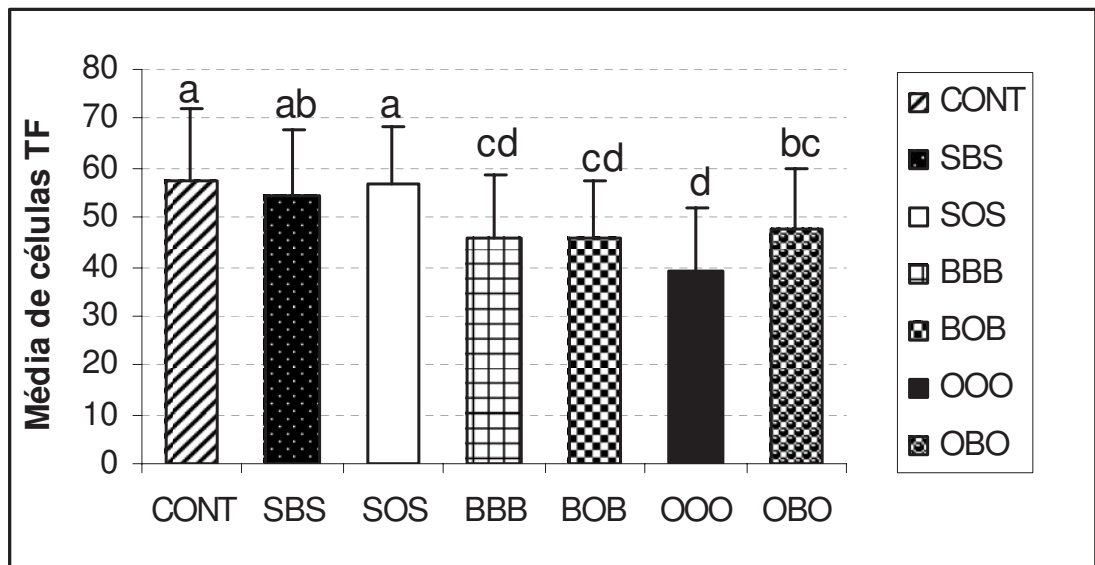


Figura 18. Representação gráfica da média do número de células do trofoblasto (TF), nos blastocistos, sob diferentes suplementos protéicos nas etapas de MIV, FIV e CIV de produção *in vitro* de embriões bovinos.

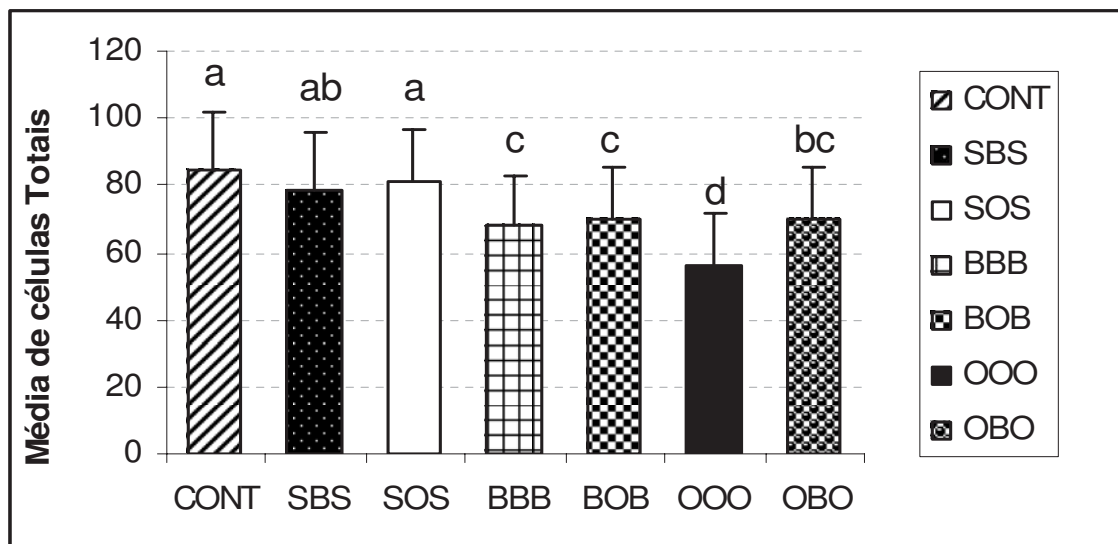


Figura 19. Representação gráfica da média do número de células totais, nos blastocistos, sob diferentes suplementos protéicos nas etapas de MIV, FIV e CIV de produção *in vitro* de embriões bovinos.

Verificou-se que a produção *in vitro* de embriões bovinos utilizando os diferentes suplementos protéicos, em diferentes combinações entre as etapas de MIV, FIV e CIV, e distribuídos em sete tratamentos, apresentou diferenças estatísticas ($p < 0,05$) em relação às médias de células da MCI nos grupos: CONT (27,27), SBS (24,55), SOS (24,58), BBB (22,36), BOB (23,94), OOO (16,79) e OBO (23,18). Assim como apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) em relação às médias de células do TF nos grupos: CONT (57,59), SBS (54,41), SOS (56,74), B (45,74), BOB (45,60), OOO (39,25) e OBO (47,35), bem como nas médias de células totais nos grupos: CONT (84,86), SBS (78,96), SOS (81,32), BBB (68,11), BOB (69,55), OOO (56,04) e OBO (69,82).

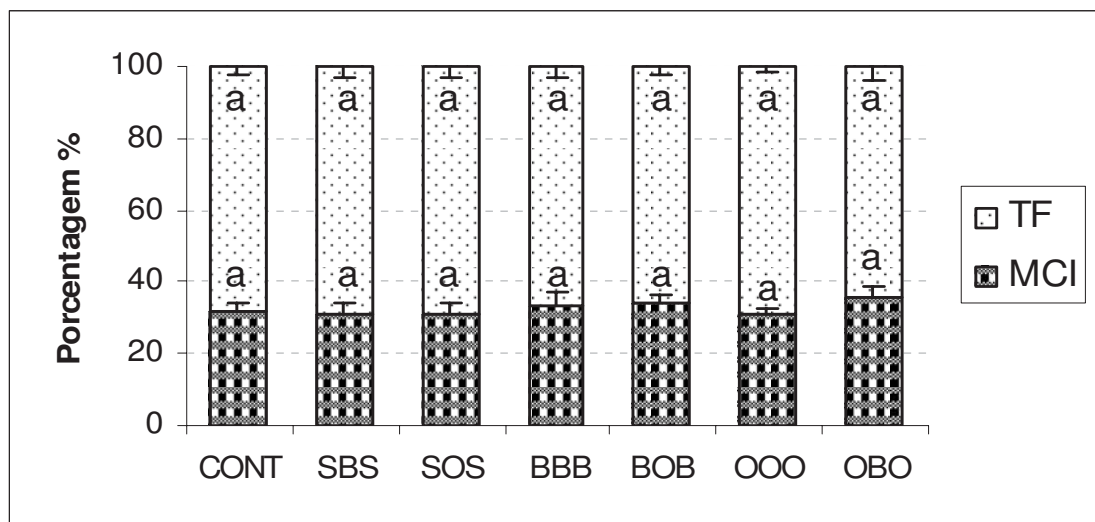


Figura 20. Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de células da MCI e do TF, em relação ao número total de células dos blastocistos produzidos sob diferentes suplementos protéicos nas etapas de MIV, FIV e CIV.

Nos diferentes tratamentos, a distribuição das células em MCI e TF foram semelhantes e demonstraram que não houve influência das diferentes fontes protéicas na alocação das células (Figura 20 e 21).

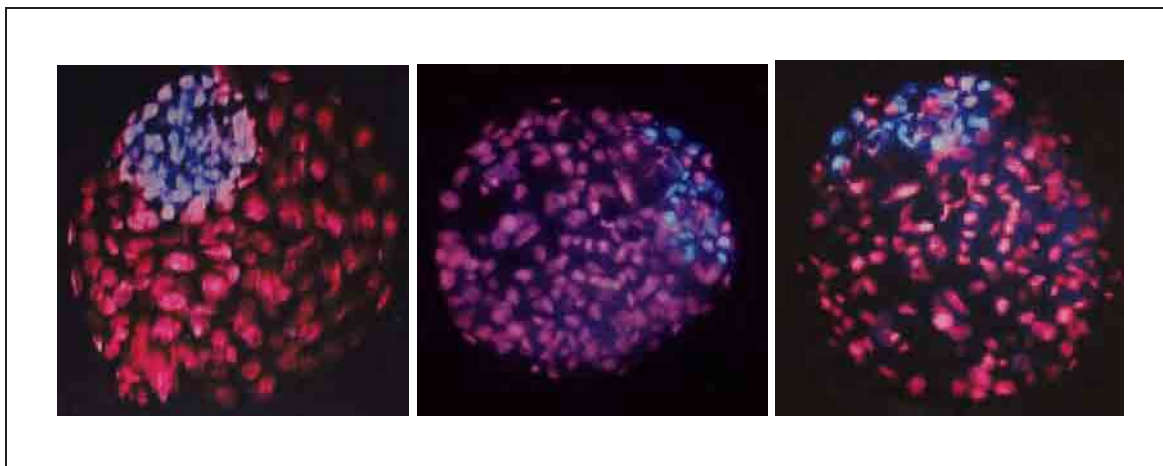


Figura 21. Fotomicrografias de blastocistos (sete dias após a FIV) avaliados pela técnica de coloração diferencial sob microscopia de epifluorescência. Azul (Hoechst 33342): núcleo das células da massa celular interna; Rosa (iodeto de propídeo + Hoechst): núcleo das células do trofoblasto.

Uma das formas mais práticas e eficientes para se avaliar a qualidade embrionária dos blastocistos que estão sendo produzidos *in vitro*, é pela técnica de quantificação do número total de células do embrião, bem como da proporção destas células que se dividem em massa celular interna (MCI) e trofoblasto (TF). Embriões bovinos de qualidade superior devem apresentar o número total de células o mais próximo do número de ciclos, que, para as condições do nosso experimento varia entre 64 a 128 células. O número total de células nos tratamentos, com diversas fontes de suplementação protéica, mostrou-se variável entre 56,04 a 84,86 células por embrião. Considerando o intervalo de avaliação, observamos que esta média foi discretamente inferior ao esperado pela idade cronológica dos blastocistos.

Em relação aos tratamentos utilizando as três fontes de suplementação protéica, SFB ou BSA, ou OVA, ficou evidente (Tabela 14 e Figuras 17 e 18), que a utilização do SFB durante a etapa de maturação é mais eficiente na PIV, independente da fonte protéica utilizada na etapa de fecundação, BSA ou OVA.

Nos tratamentos onde foi utilizado o BSA em todas as etapas (BBB), e nas combinações BSA com OVA (BOB e OBO), os embriões aparentaram-se de qualidade intermediária. Entretanto, o tratamento que se utilizou suplementação com OVA, nas três etapas (MIV, FIV e CIV), resultou em embriões com o menor número de células totais, abaixo de 64 células, correspondente ao 6º ciclo celular, os quais podem ser classificados de qualidade inferior.

Segundo Neuber et al. (2002), com a primeira diferenciação celular, durante o desenvolvimento inicial, as células da MCI originarão o feto, enquanto o TF originará as membranas extra-embrionárias, Sendo assim, torna-se interessante que o embrião apresente uma MCI com grande quantidade de células, embora deva possuir uma proporção ideal de MCI:TF, para assegurar a viabilidade embrionária, a qual ainda não foi determinada exatamente (FLEMING, 1987), portanto tem-se adotado valores próximos de 1:2 (AVELINO, 2004). A atmosfera de 5% de O₂ favorece o aumento do número de células da MCI (VAN SOOM et al., 2002).

De acordo com Garcia (2004), a média de células da MCI e TF em blastocistos suplementados com BSA na etapa de CIV foi de 58,4, e 111,2, respectivamente, enquanto que os blastocistos suplementados com SFB apresentaram a média de 42,2 células na MCI e 79,9 células no TF, sendo significativamente ($p < 0,05$) inferior. Esses resultados mostraram que a suplementação com SFB durante o CIV de embriões bovinos inibiu o desenvolvimento embrionário e provocou aumento na duração média do ciclo celular do 8º para o 9º dia, reduzindo o número de células totais dos blastocistos.

De acordo com Kuran et al. (2001), blastocistos produzidos em meio livre de proteínas possuem menos células totais que blastocistos produzidos em meio contendo albumina como principal suplemento protéico. Os blastocistos produzidos em meio contendo 10% de SFB possuíam média de 81 células totais, os produzidos em meio com 4 mg/mL de BSA, com média de 156 células totais e os produzidos em 3 mg/mL de PVA, média de 76 células totais.

Staines et al. (1999) e Takahashi e First (1992), reportaram diminuição no desenvolvimento embrionário em sistemas de cultivo livres de proteínas, as reduções também se manifestaram nas taxas de clivagem, e menor quantidade de células totais por blastocisto produzido. Entretanto, outros autores, (ECKERT e NIEMANN, 1995; KESKINTEPE e BRACKETT, 1996; KESKINTEPE et al., 1995) reportaram que não houve efeitos prejudiciais nos blastocistos produzidos em meios com a exclusão da proteína, quanto a esses parâmetros.

Garcia (2004) observou que a presença de SFB diminuiu o número de células da MCI, no entanto, a proporção MCI:TF manteve-se constante, indicando que a diferença do número de células e qualidade do blastocisto não ocorreram por efeito da diferenciação provocada pelo SFB durante o estágio final de desenvolvimento embrionário, o que infere que a influência do SFB ocorre em uma fase mais precoce do desenvolvimento embrionário.

7. CONCLUSÕES

Com a metodologia utilizada neste estudo e os resultados obtidos, pode-se concluir que:

É possível produzir embriões bovinos na ausência de SFB e/ou BSA, com a fonte protéica ovalbumina (OVA), embora tanto a quantidade como a qualidade dos blastocistos bovinos tenham se apresentado inferiores em relação àqueles produzidos na presença de SFB e BSA.

8. IMPLICAÇÕES

Embora a ovalbumina tenha apresentado resultados biológicos inferiores nas etapas de fecundação e nas etapas finais do desenvolvimento, a ovalbumina (OVA) pode ser uma fonte protéica importante e promissora pelo fato de representar menores riscos de contaminações por patógenos. Por ser de origem heteróloga (aves), os riscos de transmissão de doenças aos bovinos são menores, principalmente nos casos específicos de entraves correlacionados à exportação de embriões e às barreiras sanitárias internacionais, já que os meios quimicamente definidos também apresentam baixa eficiência.

A OVA, como fonte protéica, e a adição de substâncias que promovam melhorias na eficiência de produção, podem representar avanços na PIV de embriões bovinos.

Há necessidade ainda de se avaliar a capacidade de desenvolvimento posterior *in vivo* dos embriões produzidos *in vitro* sob essas condições de substituição pela ovalbumina, e, dessa forma, promover o estabelecimento de gestação.

9. REFERÊNCIAS

ABE, H.; YAMASHITA, S.; ITOH, T.; SATOH, T.; HOSHI, H. Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro* – matured and – fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free médium or in serum-supplemented medium. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 53, p. 325-335, 1999.

ALI, A. A.; SIRARD, M. A. Effect of the absence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 66, p. 901-905, 2002.

ANCIOTO, K. L. **Maturação nuclear e padrões de proteínas em oócitos bovinos maturados na ausência e na presença de células do *cumulus* em meio suplementado com diversas fontes de macromoléculas**. 2004. 72 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR-6023**: Informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 29p.

AVELINO, K. B. **Estimulação e inibição da síntese de glutatona em oócitos bovinos: efeitos sobre a maturação e desenvolvimento embrionário *in vitro***. 2004. 92 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

BAHR, J. M.; JOHNSON, P. A. Reproduction in poultry. In: CUPPS, P. T. **Reproduction in domestic animals**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1991. p. 555-575.

BARLIAN, A.; GANASSIN, R. C.; TOM, D.; BOLS, N. C. A comparison of bovine serum albumin and chicken ovalbumin as supplements for the serum-free growth of Chinook salmon embryo cells, CHSE-214. **Cell Biology International**, London, v. 17, p. 677-684, 1993.

BATT, P. A.; GARDNER, D. K.; CAMERON, A. W. Oxygen concentration and protein source affect the development of preimplantation goat embryos *in vitro*. **Reproduction Fertility and Development**, Melbourne, v. 3, p. 601-607, 1991.

BATT, P. A.; MILLER, B. G. Development of sheep embryos in a medium supplemented with different batches of serum albumin. **Journal of Biological Sciences**, Bombay, v. 41, p. 371-376, 1988.

BAVISTER, B. D. Culture of preimplantation embryo: facts and artifacts. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 1, p. 91-148, 1995.

BAVISTER, B. D.; KINSEY, D. L.; LANE, M.; GARDNER, D. K. Recombinant human albumin supports hamster *in vitro* fertilization. **Human Reproduction**, Oxford, v. 18, p. 113-116, 2003.

BAVISTER, B. D., ROSE-HELLEKANT, T. A., PINYOPUMMINTR, T. Development of *in vitro* matured / *in vitro* fertilized bovine embryos into morula and blastocysts in defined culture media. **Theriogenology**, Stoneham, v. 37, p. 124-46, 1992.

BAVISTER, B. D. Substitution of a synthetic polymer for protein in a mammalian gamete culture system. **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 217, p. 45-51, 1981.

BESLER, J. K.; MINE, A. R. **Major hen's egg white: ovomucoid**. In: Symposium on food, New York, n. 4, p. 137-146, 1999.

Disponível em: < [http://www.food-aller.de/symposium-vol1\(4\)/originals/besler-mine.htm](http://www.food-aller.de/symposium-vol1(4)/originals/besler-mine.htm) > Acesso em: 10 Out. 2006.

BIELANSKY, A. B. Potencial para controle ou transmissão de doenças por embriões produzidos *in vitro*: uma revisão da literatura atual. In: STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. (Ed.). **Manual da Sociedade Internacional de transferência de embriões**. 3. ed., Savoy, Illinois: IETS, 1998, Cap. 3, p. 47-56.

BIOGRAPHIES CHEMISTRY. In: Symposium International, Cap.6, 2001.

Disponível em: < <http://www.biology-online.org/dictionary/ovalbumin/albumin> >

Acesso em: 10 Out. 2006.

BOLAND, M. P.; LONERGAN, P.; O'CALLAGHAN. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. **Theriogenology**, Stoneham, v. 55, p. 1323-1340, 2001.

BRACKETT, B. G.; SEIDEL JUNIOR, G. E.; SEIDEL, S. M. (Eds.). **Technologies in animal breeding**. New York, Academic Press, 1981.

BRISON, D. R.; SCHULTZ, R. M. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 56, p. 1088-96, 1997.

BURKE, W. H. Reprodução das aves. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes - Fisiologia dos animais domésticos**. 11. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. Cap. 38, p. 660-680.

CAMOUS, S.; HEYMAN, Y.; MEZIOU, W.; MENEZO, Y. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 72, p. 479-485, 1984.

CARNEIRO, G. F.; LIU, I. K. M.; HYRE, D.; ANDERSON, G. B.; LORENZO, P. L.; BALL, B. A. Quantification and distribution of equine oocyte cortical granules during meiotic maturation and after activation. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 63, p. 451-58, 2002.

CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; VAN LANGENDONCKT, A.; MERMILLOD, P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Theriogenology**, Stoneham, v. 43, p. 1115-28, 1995.

CHA, K. Y.; CHIAN, R. C. Maturation *in vitro* of immature human oocytes for clinical use. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 4, p. 103-120, 1998.

CHEN, R. F. Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment. **The Journal Biology Chemistry**, Bethesda, v. 242, p. 173-181, 1966.

CHERR, G. N.; DROBNIS, E. Z.; KATZ, D. F. Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 246, p. 81-93, 1988.

CHOHAN, K. R.; HUNTER, A. G. Effect of reproductive status on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. **Journal of Veterinary Science**, Seoul, v. 4, n. 1, p. 67-72, 2003.

COHN, E. J.; HUGHES JR., W. L.; WEARE, J. H. Preparation and properties of serum and plasma proteins. Crystallization of serum albumins from ethanol-water mixtures. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 69, p.1753-1761, 1947.

CRAN, D. Cortical granules during oocyte maturation and fertilization. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 38, p. 49-62, 1989.

DAMIANI, P.; FISSORE, R. A.; CILELLI, J. B.; LONG, C. R.; BALISE, J. J.; ROBL, J. M.; DUBY, R. T. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 45, p. 521-34, 1996.

DALVIT, G.; LLANES, S. P.; DESCALZO, A.; INSANI, M.; BECONI, M.; CETICA, P. Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte *in vitro* maturation. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 40, p. 93-97, 2005.

DE MATOS, D. G.; FURNUS, C. C.; MOSES, D. F.; MARTINEZ, A. G.; MATKOVIC, M. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 45, p. 451-57, 1996.

DIELEMAN, S. J. Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, p. 05-20, 2002.

DODE, M. A. N.; ADONA, P. R. Developmental capacity of *bos indicus* oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6-dimethylaminopurine. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 65, p.157-170, 2001.

DODE, M. A. N.; GRAVES, C. Involvement of steroid hormones on *in vitro* maturation of pig oocytes. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, p. 99-110, 2003.

DULCIBELLA, T.; DUFFY, P.; REINDOLLAR, R.; SU, B. Changes in the distribution of mouse oocyte cortical granules and ability to undergo the cortical reaction during gonadotropin stimulated meiotic maturation and aging *in vivo*. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 43, p. 870-6, 1990.

ECKERT, J.; NIEMANN, H. *In vitro* maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. **Theriogenology**, Stoneham, v. 43, p. 1211-1225, 1995.

ECKERT, J.; PUGH, P. A.; THOMPSON, J. G.; NIEMANN, H.; TERVIT, H. R. Exogenous protein affects developmental competence and metabolic activity of bovine pre-implantation embryos *in vitro*. **Reproduction Fertility and Development**, Melbourne, v. 10, p. 327-332, 1998.

FAIR, T.; HULSHOF, S. C. J.; HYTTEL, P. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anatomy and Embriology**, Berlin, v. 195, p. 327-336, 1997.

FARIN, P. W.; CROSIER, A. E.; FARIN, C. E. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 55, p. 151-170, 2001.

FARIN, P. W.; FARIN, C. E. Transfer of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*: survival and fetal development. **Biology Reproduction**, Champaign, v. 52, p. 676-682, 1995.

FLEMING, T. P. A quantitative analysis of cell allocation to trophectoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst. **Developmental Biology**, San Diego, v. 119, n. 2, p. 520-31, 1987.

FLOOD, L. P.; SHIRLEY, B. Reduction of embryotoxicity by protein in embryo culture media. **Molecular Reproduction Development**, New York, v. 30, p. 226-231, 1991.

FUKUI, Y.; MCGOWAN, L. T.; JAMES, R. W.; PUGH, P. A.; TERVIT, H. R. Factors affecting the *in vitro* development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 92, p. 125-131, 1999.

FUKUI, Y.; SAKUMA, Y. Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro*: relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of *cumulus* cells. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 22, p. 669-673, 1980.

GANDHI, A. P.; LANE, M.; GARDNER, D. K.; KRISHER, R. L. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. **Human Reproduction**, Oxford, v. 15, p. 395-401, 2000.

GARCIA, S. M. **Bloqueio e morte celular programada em embriões bovinos: efeitos da fonte de suplementação protéica e da cinética do desenvolvimento**. 2004. 92 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.

GARDNER, D. K.; LANE, M. **Embryos culture systems**. In: GARDNER, D. K.; TROUNSON, A. O., (Ed.). New York: CRC Press, 1993, p. 84-105.

GARDNER, D. K.; LANE, M.; MAYBACH, J. M.; HASLER, J. F. Bovine oocyte maturation in a completely defined medium: replacing serum with recombinant albumin and hyaluronan. **Theriogenology**, Stoneham, v. 55, p. 471, 2001.

GARDNER, D. K.; LANE, M.; SPITZER, A.; BATT, P. A. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. **Biology Reproduction**, Champaign, v. 50, p. 390-400, 1994.

GESHI, M.; TAKENOUCI, N.; YAMAUCHI, N.; NAGAI, T. Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without *cumulus* cells. **Biology Reproduction**, Champaign, v. 63, p. 1730-1734, 2000.

GONÇALVES, F. S. **Efeitos de antioxidantes adicionados ao meio de fecundação *in vitro* sobre a capacitação espermática e desenvolvimento embrionário em bovinos.** 2006. 140 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

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

GUERIN, B.; LE GUIENNE, B.; THIBIER, M. Absence de contamination microbiologique des embryos bovine fécondés *in vitro*. **Bull Academic Veterinarian France**, Paris, v. 61, p. 513-520, 1988.

HADRI, A. A.; GWATKIN, R. B. L. Requirements for the maturation of hamsters oocytes from preovulatory follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 35, p. 173-176, 1973.

HALL, A. G. The role of glutathione in the regulation of apoptosis. **European Journal of Clinical Investigation**, Oxford, v. 29, p. 238-45, 1999.

HAN, M. S.; NIWA, K. Effects of BSA and fetal bovine serum in culture medium on development of rat embryos. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 49, p. 235-242, 2003.

HASLER, J. F. *In vitro* production of cattle embryos problems with pregnancies and parturition. **Human Reproduction**, Oxford, v. 15, p. 47-58, 2000.

HAWK, H. W.; WALL, R. J. Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro* produced oocytes II. Media and co-culture cells. **Theriogenology**, Stoneham, v. 41, p. 1585-94, 1994.

HOLM, P.; BOOTH, P. J.; CALLESEN, H. Kinetics of early *in vitro* development of bovine *in vivo* and *in vitro* derived zygotes produced and/ or cultured in chemically defined or serum containing media. **Reproduction**, Cambridge, v. 123, p. 553-565, 2002.

HOSOE, M.; SHIOYA, Y. Distribution of cortical granules in classified bovine oocyte. **Theriogenology**, Stoneham, v. 45, p. 274, 1996.

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

IWASAKI, S.; YOSHIBA, N.; USHIJIMA, H.; WATANABE, S.; NAKAHARA, T. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 90, p. 279-85, 1990.

JOHANSON, K. O. Refolding of bovine serum albumin and its proteolytic fragments. Regain of disulfide bonds, secondary structure and ligand binding. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 256, p. 445-450, 1981.

KAAEKUAHIWI, M. A.; MENINO, A. R. JR. Relationship between plasminogen activator production and bovine embryo development *in vitro*. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, p. 2009-2014, 1990.

KANE, M. T. A low molecular weight extract of bovine serum albumin stimulates rabbit blastocyst cell division and expansion *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 73, p. 147-150, 1985.

KANE, M. T.; BAVISTER, B. D. Protein-free culture medium containing polyvinylalcohol, vitamins, and amino acids supports development of eight-cell hamster embryos to hatching blastocysts. **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 247, p. 183-187, 1988.

KANE, M. T. Culture media and culture of early embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 27, p. 49-57, 1987.

KANE, M. T.; HEADON, D. R. The role of commercial bovine serum albumin preparations in the culture of one-cell rabbit embryos to blastocysts. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 60, p. 469-475, 1980.

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

KESKINTEPE, L.; BURNLEY, C. A.; BRACKETT, B. G. Production of viable bovine blastocysts in defined *in vitro* conditions. **Biology Reproduction**, Champaign, v. 52, p.1410-1417, 1995.

KIM, K. S.; MINAMI, N.; YAMADA, M.; UTSUMI, K. Follicular cells affect the fertilizability and developmental competency of bovine oocytes *in vitro*. **Reproduction Fertility and Development**, Melbourne, v. 9, p. 763-766, 1997.

KIM, K. S.; MINAMI, N.; YAMADA, M.; UTSUMI, K. Functional role of *cumulus* cells during maturation in development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 45, p. 278, 1996.

KNIJN, H. M.; GJORRET, J. O.; VOS, P. L.; HENDRIKSEN, P. J.; VAN DER WEIJDEN, B. C.; MADDOX-HYTTEL, P.; DIELEMAN, S. J. Consequences of *in vitro* development and subsequent culture on apoptosis, cell number, and blastocyst formation in bovine embryos. **Biology Reproduction**, Champaign, v. 69, p. 1371-1378, 2003.

KRISHER, R. L.; BAVISTER, B. D. Enhanced glycolysis after maturation of bovine oocytes *in vitro* is associated with increased developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 53, p. 19-26, 1999.

KRISHER, R. L.; BAVISTER, B. D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, Stoneham, v. 49, p. 103-114, 1998.

KRISHER, R. L.; LANE, M.; BAVISTER, B. D. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 60, p. 1345-1352, 1999.

KUPKER, W.; DIEDRICH, K.; EDWARDS, R. G. Principles of mammalian fertilization. **Human Reproduction**, Oxford, v. 13, p. 20-32, 1998.

KURAN, M.; ROBINSON, J. J.; STAINES, M. E.; MCEVOY, T. G. Development and de novo protein synthetic activity of bovine embryos produced *in vitro* in different culture systems. **Theriogenology**, Stoneham, v. 55, p. 593-606, 2001.

LANE M.; GARDNER D. K. Nonessential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes *in vitro*. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, New York, v. 14, n. 7, p. 398-403, 1997.

LEAL, C. L. V.; ADONA, P. R. O bloqueio meiótico e a maturação *in vitro*. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 34 (Supl. 1), p. 131-144, 2006.

LEESE, H. J.; TAY, J. I.; REISCHL, J.; DOWNING, S. Formation of fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. **Reproduction**, Cambridge, v. 121, p. 339-346, 2001.

LEESE, H. J. The formation and function of oviduct fluid. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 82, p. 843-856, 1988.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; CRITSER, E. S.; EYESTONE, W. H.; NORTHEY, D. L.; FIRST, N. L. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 36, p. 376-83, 1987.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; CRITSER, E. S.; FIRST, N. L. Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 35, p. 850-857, 1986.

LIM, J. M.; MEI, Y.; CHEN, B.; GODKE, R. A.; HANSEL, W. Development of bovine IVF oocytes cultured in medium supplemented with a nitric oxide scavenger or inhibitor in a co-culture system. **Theriogenology**, Stoneham, v. 51, p. 941-949, 1999a.

LIM, J. M.; MEI, Y.; CHEN, B.; GODKE, R. A.; HANSEL, W. Development of *in vitro* derived bovine embryos cultured in 5% CO₂ in air or 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂. **Human Reproduction**, Oxford, v. 14, p. 458-464, 1999b.

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

LITTLELL, C. R.; MILLIKEN, A. G.; STROUP, W. W.; WOLFINGER, D. R. **SAS system for mixed models**. Cary: SAS Institute, 1996, p.633.

LIU, Z.; FOOTE, R. H. Effects of amino acids on the development of *in vitro* matured/*in-vitro* fertilization bovine embryos in a simple protein free medium. **Human Reproduction**, Oxford, v. 10, n. 11, p. 2985-91, 1995.

LIU, L.; TRIMARCHI, J. R.; NAVARRO, P.; BLASCO, M. A.; KEEFE, D. L. Oxidative stress contributes to arsenic-induced telomere sttrition, chromosome instability and apoptosis. **The Journal Biology Chemistry**, Bethesda, v. 26, p. 31998-32004, 2003.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; KHATIR, H.; CESARONI, G.; MERMILLOD, P. Effect of protein synthesis inhibition before or during *in vitro* maturation on subsequent development of bovine oocytes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 50, p. 417-431, 1998.

LONERGAN, P.; O'KEARNEY-FLYNN, M.; BOLAND, M. P. Effect of protein supplementation and presence of antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. **Theriogenology**, Stoneham, v. 51, p. 1565-1576, 1999.

MEHTA, T. S.; KIESSLING, A. A. Development potential of mouse embryos conceived in vitro and cultured in ethylenediaminetetraacetic acid with or without amino acids or serum. **Biology Reproduction**, Champaign, v. 43, p. 600-606, 1990.

MEIRELLES, F. V.; CAETANO, A. R.; WATANABE, Y. F.; RIPAMONTE, P.; CARAMBULA, S. F.; MERIGHE, G. K.; GARCIA, S. M. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82-83, p. 13-20, 2004.

MENEZO, Y.; RENARD, J. P.; DELOBEL, B.; PAGEAUX, J. F. Kinetic study of fatty acid composition of day 7 to day 14 cow embryos. **Biology Reproduction**, Champaign, v. 26, p. 787-790, 1982.

MÉO, S. C. **Ativação partenogenética e desenvolvimento embrionário inicial de oócitos bovinos tratados com estrôncio, ionomicina e 6-dimetilaminopurina**. 2002. 86 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária - Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias “Júlio de Mesquita Filho”, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

MÉO NICIURA, S. C. **Interação núcleo-citoplasmática em embriões e expressão de genes “imprinted” em fetos bovinos produzidos *in vivo*, *in vitro* e partenogenéticos**. 2005. 115 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária - Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias “Júlio de Mesquita Filho”, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

MILHAM, C. N.; TORNESI, M. B.; PALASZ, A. T.; ARCHER, J. Effect of donor bovine serum fractionation on preimplantation mouse embryos in culture. **Theriogenology**, Stoneham, v. 41, p. 241-257, 1994.

MINGOTI, G. Z.; GARCIA, J. M.; ROSA-E-SILVA, A. A. M. The effect of serum on *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and steroidogenesis of bovine oocytes co-cultured with granulosa cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 28 (2), p. 213-218, 1995.

MINGOTI, G. Z. **Maturação oocitária associada à esteroidogênese: papel do soro sanguíneo, albumina sérica e hormônios esteróides**. 2000. 141 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

NEUBER, E.; LUETJENS, C. M.; CHAN, A. W. S.; SCHATTEEN, G. M. Analysis of DNA fragmentation of *in vitro* cultured bovine blastocysts using TUNEL. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, p. 2193-202, 2002.

NEURATH, H., (Ed.) **The proteins: composition, structure and function**. 2nd ed., London, Academic Press, 1965. v. 3, p. 134-162.

NORTH, A. C. T. Characterization of protein conformation and function. In: FRANKS, F. (Ed.). **Description and classification of proteins**. London: Symposium Press, 1979. p. 253-257.

PINYOPUMMINTR, T.; BAVISTER, B. D. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effects of type of serum, of its inclusion and heat inactivation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 41, p. 1241-1249, 1994.

PINYOPUMMINTR, T.; BAVISTER, B. D. Effect of amino acids on development *in vitro* of cleavage-stage bovine embryos into blastocysts. **Reproduction Fertility and Development**, Melbourne, v. 8, p. 835-41, 1996.

PONDERATO, N.; CROTTI, G.; TURINI, P.; DUCHI, R.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Embryonic and foetal developmental of bovine oocytes treated with a combination of butyrolactone I and roscovitine in an enriched medium prior to IVM and IVF. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 62, p. 513-518, 2002.

PRATTEN, M. K.; BROOKE, A. M.; BROOME, S. C.; BECK, F. The effect of epidermal growth factor insulin and transferrin on the growth-promoting properties of serum depleted by repeated culture of postimplantation rat embryos. **Development**, Cambridge, v. 104, p. 137-145, 1988.

RIZOS, D.; GUTIE'RREZ-ADA'N, A.; PE'REZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 68, p. 236-243, 2003.

SAEKI, R.; KATO, H.; HOSOI, Y.; MIYAKE, M.; UTSUMI, K.; IRITANI, A. Early morphological events of in vitro fertilized bovine oocytes with frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v. 35, p. 1051-1059, 1991.

SAEKI, K.; NAGAO, Y.; KISHI, M.; NAGAI, M. Developmental capacity of bovine oocytes following inhibition of meiotic resumption by cicloheximide or 6-dimethylaminopurine. **Theriogenology**, Stoneham, v. 48, p. 1161-1172, 1997.

SANBUISHO, A.; THRELFALL, W. R. The influence of serum and gonadotropins on bovine oocyte maturation *in vitro*. **Theriogenology**, Stoneham, v. 29, p. 301, 1988.

SATO, E.; IRITANI, A.; NISHIKAWA, Y. Factors involving *in vitro* maturation of pig and cattle follicular oocytes cultured *in vitro*. **Japanese Journal of Animal Reproduction**, Tokyo, v. 23, p. 12-18, 1977.

SHAMSUDDIN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Fine structure of bovine blastocysts developed either in serum-free medium or in conventional co-culture with oviduct epithelial cells. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v. 41, p. 307-316, 1994.

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

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, Stoneham, v. 49, p. 483-497, 1998.

SORIA, G. F. **Embriões bovinos desenvolvidos em sistemas de cultivos quimicamente definidos ou suplementados com fontes protéicas**. 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

STAINES, M. E.; KING, M. E.; MCCALLUM, G. J.; WATT, R. G.; DOLMAN, D. F.; MCEVOY, T. G. Bovine embryo production *in vitro*, using oocytes collected from both FSH-stimulated and unstimulated ovaries, in a system that restricts protein supplementation to the fertilization phase. **Theriogenology**, Stoneham, v. 51, p. 332, 1999.

SUSS, U.; WUTRICH, K.; STRANZINGER, G. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured *in vitro*. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 38, p. 871-880, 1988.

TAKAGI, M. Impaired final follicular maturation in heifers after superovulation with recombinant human FSH. **Reproduction**, Cambridge, v. 121, p. 941-951, 2001.

TAKAHASHI, Y.; FIRST, N. L. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins.

Theriogenology, Stoneham, v. 37, p. 963-978, 1992.

TAKAHASHI, M.; KEICHO, K.; TAKAHASHI, H.; OGAWA, H.; SCHULTZ, R. M.; OKANO, A. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in *in vitro* cultured bovine embryos by comet assay. **Theriogenology**, Stoneham, v. 54, p. 137-145, 2000.

THIBIER, C.; DENOULET, P.; JESSUS, C.; OZON, R. A predominant basic alpha-tubulin isoform present in prophase *Xenopus* oocyte decreases during meiotic maturation. **Biology of the Cell**, Paris, v. 75 (3), p. 173-180, 1992.

THOMPSON, J. G. Cultura *in vitro* de embriões bovinos: novas técnicas e consequências pós-transferência. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v. 27, p. 133-146, 1999, Suplemento.

THOMPSON, J. G. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-61, p. 263-275, 2000.

THOMPSON, J. G.; SHERMAN, A. N.; ALLEN, N. W.; MCGOWAN, L. T.; TERVIT, H. R. Total protein content and protein synthesis within pre-elongation stage bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 50, p. 139-145, 1998.

TORNESI, B.; PALASZ, A. T.; DEL CAMPO, M. R.; ROUSSEAU, C. G.; ARCHER, F. J.; MAPLETOFT, R. J. *In vitro* culture of preimplantation mouse embryos and day 12 limbuds: effects of serum and albumin. **Reproduction Toxicology**, Cambridge, v. 7, p.623-630, 1993.

TSAFRIRI, A. The control of meiotic maturation in mammals. In: METZ, C.; MONROY, A. **Biology of fertilization**. Nova York: Academic Press, 1985, v. 1, p. 221-252.

UTO, N.; YAMAHAMA, Y. The motility and fertility of golden hamster sperm cultured in BSA-free medium. **Biology of the Cell**, Paris, v. 88, p. 23-28, 1996.

VANROOSE, G.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. From co-culture to defined medium: state of the art and practical considerations. **Reproduction of Domestic Animals**, Berlin, v. 36, p. 25-28, 2001.

VAN SOOM, A.; BOERJAN, M. L.; BOLS, P. E. J.; VANROOSE, G.; LEIN, A.; CORYN, M. et al. Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced *in vivo* after superovulation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 57, p. 1041-49, 1997.

VAN SOOM, A.; YUAN, Y. Q.; PEELMAN, L. J.; DE MATOS, D. G.; DEWULF, J.; LAEVENS, H.; DE KRUIF, A. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, p. 1453-1465, 2002.

VAN WAGTENDONK-DE-LEEuw, A. M.; MULLAART, E.; DE ROOS, A. P.; MERTON, J. S.; DEN DAAS, J. H.; KEMP, B.; DE RUIGH, L. Effects of different reproduction techniques, AI, MOET or PIV, on health and welfare of bovine offspring. **Theriogenology**, Stoneham, v. 53, p. 575-97, 2000.

VISCONTI, P. E.; BAILEY, J. L.; MOORE, G. D.; PAN, D.; OLDS-CLARKE, P.; KOPF, G. S. Capacitation of mouse spermatozoa: correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. **Development**, Cambridge, v. 121, p. 1129-1150, 1995.

WATSON, A. J.; DE SOUSA, P.; CAVENEY, A.; BARCROFT, L. C.; NATALE, D.; URQUHART, J.; WESTHUSIN, M. E. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 62, p. 355-364, 2000.

WITTMANN, T.; HYMAN, A.; DESAI, A. The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. **Nature Cell Biology**, London, v. 3, p. 28-34, 2001.

WOLF, A. **Estímulo da síntese de glutatona na maturação *in vitro* de oócitos bovinos e sua influência no desenvolvimento embrionário**. 2005. 101f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

WRENZYCKI, C.; HERMANN, D.; CARNWATH, J. W.; NIEMANN, H. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 53, p. 8-18, 1999.

WRIGHT, Jr. R. J.; BONDIOLI, K. B. Aspects of in vitro fertilization and embryo culture in domestic animals. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 53, p. 702-728, 1981.

YANG, X.; KUBOTA, C.; SUZUKI, H.; TANEJA, M.; BOLS, P. E. J.; PRESICCE, G. A. Control of oocyte maturation in cows – Biological factors. **Theriogenology**, Stoneham, v. 49, p. 471-482, 1998.

ZENG, M. Y.; LEE, S. P.; CHEN, D. B.; COTA, J.; SIERO, V.; YASUKAWA, K.; HARPER, M. J. K. Leukemia inhibitory factor, LIF receptor, and gp130 in the mouse uterus during early pregnancy. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 42, p. 407-414, 1995.

ZHANG, X.; ARMSTRONG, D. T. Presence of amino acids and insulin in a chemically defined medium improved development of 8-cell rat embryos *in vitro* and subsequent implantation *in vivo*. **Biology Reproduction**, Champaign, v. 42, p. 662-668, 1990.