

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

Produção *in vitro* de embriões bovinos cultivados  
em duas atmosferas gasosas utilizando diferentes  
sistemas de tamponamento

***Sabrina Silveira Assaf***

Botucatu – SP  
2007

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

Produção *in vitro* de embriões bovinos cultivados  
em duas atmosferas gasosas utilizando diferentes  
sistemas de tamponamento

***Sabrina Silveira Assaf***

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-  
Graduação em Medicina Veterinária para  
obtenção do título de Doutor.

Orientador (a): Profa. Dra. Eunice Oba

Botucatu – SP  
Agosto 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

**BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus**

Assaf, Sabrina Silveira.

Produção *in vitro* de embriões bovinos cultivados em duas atmosferas gasosas utilizando diferentes sistemas de tamponamento / Sabrina Silveira Assaf. – Botucatu [s.n.], 2007.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007.

Orientador: Eunice Oba

Assunto CAPES: 50504007

1. Bovino – Reprodução 2. Bovino - Inseminação artificial 3. Fertilização *in vitro*

CDD 636.208246

Palavras-chave: Atmosfera gasosa; Cultivo; Embriões bovinos; Produção *in vitro*; Sistema de tamponamento

**Autor (a):** *Sabrina Silveira Assaf*

**Título:** *Avaliação das modificações no sistema de Produção in vitro de embriões bovinos cultivados em duas atmosferas gasosas*

**Comissão Examinadora**

*Profª Drª Eunice Oba /AS.:* \_\_\_\_\_

Presidente e Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

*Profª Drª Yeda Fumie Watanabe /AS.:* \_\_\_\_\_

Membro

Vitrogen® - Pesquisa e Desenvolvimento em Biotecnologia da Reprodução Ltda.

Cravinhos - SP

*Profª Drª Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção /AS.:* \_\_\_\_\_

Membro

Departamento de Reprodução Animal

FMVZ – USP – São Paulo

*Profª Drª Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga /AS.:* \_\_\_\_\_

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

*Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo /AS.:* \_\_\_\_\_

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

**Data e local da defesa:** 15 de agosto de 2007, Botucatu, SP.

## *Epígrafe*

*"Meu refúgio, minha fortaleza, meu Deus, eu confio em ti! Caíam mil ao seu lado e dez mil à sua direita, à você nada atingirá... pois Deus ordenou aos seus anjos que guardem você em seus caminhos. Eles o levarão nas mãos, para que seu pé não tropece numa pedra." (Salmo 91 – O justo confia em Deus)*



*"Seja o que for que você faz ou sonha fazer, comece. A audácia tem força, poder e magia. Comece agora."*

**(Johann Goethe)**

## *Dedicatória*

*...à minha família querida pelo apoio, amor  
e por constituírem o alicerce de minha  
formação.....Amo-os com todo meu coração!*



## *Agradecimentos*

*À Deus pelo dom da vida.*

*À Profa. Dra. Eunice Oba* pelo apoio nas atividades acadêmicas e pelos ensinamentos de vida.

*À CAPES* (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro.

*À Profa. Dra. Maria Denise Lópes* pelo incentivo pedagógico.

*À Profa. Dra. Fernanda Landim-Alvarenga* por permitir a utilização do Laboratório de PIV da FMVZ-UNESP.

*Aos colegas, professores e funcionários* do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária pelos bons momentos de convívio.

*A todas as pessoas especiais* que de alguma forma colaboraram com meu desenvolvimento científico e pessoal.

*Obrigada!*

## ***LISTA DE FIGURAS***

|                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1–</b> Fotomicrografias em estereomicroscópio Leica® .....                         | 31 |
| <b>Figura 2–</b> Fotomicrografias em estereomicroscópio e microscópio invertido Leica® ..... | 33 |
| <b>Figura 3–</b> Estágios iniciais do desenvolvimento embrionário.....                       | 49 |
| <b>Figura 4–</b> Fotomicrografia de embriões PIV.....                                        | 50 |
| <b>Figura 5–</b> Fotomicrografia de embriões PIV.....                                        | 55 |

## ***LISTA DE TABELAS***

**Tabela 1-** Taxas de maturação nuclear obtidas a partir de 10% dos ovócitos que foram aspirados e selecionados quanto aos critérios morfológicos de qualidade.....43

**Tabela 2-** Médias e desvios padrão das taxas de clivagem, mórulas e blastocistos para os ovócitos cultivados a 39°C, 5% de CO<sub>2</sub> 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>.....47

**Tabela 3-** Média e desvios padrão das taxas de clivagem, mórulas e blastocistos para os ovócitos cultivados a 39°C, 5% de CO<sub>2</sub> em ar e 100% de umidade relativa.....54

**Tabela 4-** Porcentagem média de clivagem, mórula e blastocisto de acordo com o sêmen utilizado na fertilização dos ovócitos nas duas atmosferas gasosas.....58

# SUMÁRIO

|                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMO.....                                                      | 1  |
| ABSTRACT.....                                                    | 4  |
| 1 INTRODUÇÃO.....                                                | 7  |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA.....                                     | 12 |
| 2.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões .....                   | 12 |
| 2.2 Maturação ovocitária.....                                    | 15 |
| 2.3 Meios de cultivo embrionário.....                            | 20 |
| 2.4 Mecanismo de ação dos sistemas tampões utilizados na PIV.... | 24 |
| 2.5 Atmosfera gasosa.....                                        | 27 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS.....                                        | 29 |
| 3.1 Coleta dos ovários e seleção dos ovócitos.....               | 29 |
| 3.2 Maturação <i>in vitro</i> dos ovócitos.....                  | 30 |
| 3.3 Coloração dos ovócitos para maturação nuclear.....           | 31 |
| 3.4 Fecundação <i>in vitro</i> dos ovócitos.....                 | 34 |
| 3.5 Cultivo <i>in vitro</i> .....                                | 35 |

|     |                                                                                                          |    |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.6 | Elaboração dos meios de cultivo e critérios utilizados para<br>avaliação do pH dos meios preparados..... | 37 |
| 3.7 | Análise estatística.....                                                                                 | 39 |
| 3.8 | Esquema das medições de pH.....                                                                          | 39 |
| 4   | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                                              | 40 |
| 5   | CONCLUSÕES.....                                                                                          | 61 |
| 6   | BIBLIOGRAFIA.....                                                                                        | 63 |
| 7   | APÊNDICE.....                                                                                            | 88 |
| 8   | TRABALHOS CIENTÍFICOS.....                                                                               | 94 |

## **RESUMO**

### **Produção *in vitro* de embriões bovinos cultivados em duas atmosferas gasosas utilizando diferentes sistemas de tamponamento**

Uma variedade de fatores extrínsecos como íons orgânicos, tampões, composição atmosférica gasosa, aminoácidos, fatores de crescimento, vitaminas, a ação de proteínas e macromoléculas desconhecidas podem afetar a viabilidade embrionária. A implantação de um sistema artificial de manutenção e desenvolvimento embrionário que simule um ambiente compatível com o fisiológico ainda é o objetivo de diversos grupos de pesquisa. O tamponamento dos meios é dependente da composição gasosa da atmosfera de cultivo e o desenvolvimento embrionário, principalmente na fase de cultivo, sofre com as variações de pH verificadas durante as manipulações realizadas fora da estufa. Os experimentos desenvolvidos tiveram como objetivo avaliar diferentes sistemas de tamponamento para os meios de cultivo, comparando-os entre si quanto à capacidade de proporcionarem maior estabilidade de pH aos embriões produzidos *in vitro*. As modificações propostas na composição dos meios de cultivo foram avaliadas em duas atmosferas gasosas. Um total de 3200 ovócitos foram maturados em gotas de 100 µL cobertas com óleo mineral por período de 24 horas, agrupados em número de 20 ovócitos por gota de meio TCM-199 com sais de Hank's

(Sigma Aldrich®), acrescido de 0,5 µg/mL de FSH e 0,03 UI/mL de LH, 10% SFB, 20mM HEPES e antibióticos. Após a fertilização, os possíveis zigotos foram submetidos ao cultivo e distribuídos de acordo com os seguintes tratamentos (T): T1: grupo controle com sistema tampão de bicarbonato de sódio do meio HTF Irvine Scientific® acrescido de aminoácidos; T2: meio SOFaa com sistema tampão composto de 25 mM de bicarbonato de sódio; T3: meio SOFaa modificado pela associação do sistema tampão com 9 mM de bicarbonato de sódio e 4 mM de HEPES e T4: meio SOFaa modificado pela associação do sistema tampão com 9 mM de bicarbonato de sódio e 12 mM de fosfato de sódio. Os embriões dispostos nos quatro tratamentos foram cultivados a temperatura de 39° C, de acordo com duas atmosferas gasosas: 5% de CO<sub>2</sub> com 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> em ar e 100% de umidade relativa do ar. Os resultados obtidos para as taxas de clivagem nos quatro tratamentos quando o cultivo foi efetuado em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> , 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub> foram respectivamente: 70%, 74%, 49% e 41%. Para as taxas de mórulas foram: 34%, 38%, 24% e 17,6% e para blastocistos 21%, 21%, 13% e 9% na mesma atmosfera de cultivo. Já quando o cultivo foi efetuado em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar e 100% de umidade relativa, os resultados obtidos para as taxas de clivagem nos quatro tratamentos foram respectivamente: 38%, 34,5%, 30,4% e 21,5%. Para as taxas de mórulas foram: 20,4%, 18,3%, 14,6% e 11% e para blastocistos 12,4%, 11%, 8,6% e 6% na mesma atmosfera de cultivo. Esses dados indicaram que a adição de baixas concentrações de

HEPES ao sistema de cultivo, não apresentou efeito deletério na taxa de produção de blastocistos em ambas atmosferas testadas. A estabilidade de pH obtida com as modificações propostas foi benéfica durante os períodos de análise da clivagem e troca de meio, quando os embriões ficaram expostos a atmosfera ambiente. A atmosfera composta de 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub> a temperatura de 39° C proporcionou melhor desenvolvimento embrionário em todos os tratamentos (P<0,05). No entanto, é importante reforçar que ainda existe a necessidade de aperfeiçoamento na formulação dos meios de cultivo que dispensam o co-cultivo celular e de seus sistemas de tamponamento com o intuito de proporcionar condições de estabilidade às variações de pH verificadas nos procedimentos de PIV e que conseqüentemente possibilitarão maior viabilidade à execução de técnicas como congelamento e vitrificação de embriões.

**Palavras-chave:** embriões bovinos, produção *in vitro*, cultivo, sistema de tamponamento, atmosfera gasosa.

## ***ABSTRACT***

### ***IN VITRO PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS IN TWO GASEOUS ATMOSPHERES: EFFECT OF DIFERENTS BUFFER SYSTEM***

A variable interaction of intrinsic and extrinsic factors such as organics ions, buffers, atmosphere composition, aminoacids, growth factors, vitamins, proteins and other unknown components may play an important role increasing the developmental potential of in vitro produced bovine embryos. The importance of the development of an artificial system to maintain embryo viability, similar and comparable with physiologic environment, has been the objective of several studies. Therefore, the majority of those studies that focus on culture media formulations were based on the physiology of in vivo produced embryo. However, the development of commercial protocols that ensure embryo quality after in vitro production (IVP) demands some adaptations while considering the differences between in vivo and in vitro produced embryos. Media buffering depends on the gaseous atmosphere utilized during culture and embryo development is sensitive to pH variation during culture, especially in manipulations in the bench. The aim of the present study was to investigate the effect of different buffer systems in the pH stability of culture medium and in the developmental capacity of IVP embryos. 3200

COCs were cultured for 24h, using 20 oocytes per 100 $\mu$ L droplet in TCM 199 (with Hanks'salts: Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), containing 10% fetal bovine serum, 20mM HEPES and antibiotics under sterile paraffin oil. After fertilization, the zygotes were cultivated according with treatments (T): T1- control group with NaHCO<sub>3</sub> (sodium bicarbonate) in medium HTF Irvine Scientific®; T2- group with 25 mM NaHCO<sub>3</sub> in medium SOFaa; T3 – group with 9mM NaHCO<sub>3</sub> and 4 mM HEPES in medium SOFaa and T4 – group with 9mM NaHCO<sub>3</sub> and 12 mM sodium phosphate in medium SOFaa. The embryos were exposed in two ambient: atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> + 5% O<sub>2</sub> + 90% N<sub>2</sub> at 39° C and atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> in air at 39° C and 100% humidity. For the atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> + 5% O<sub>2</sub> + 90% N<sub>2</sub> at 39° C the rates of clivage in the four treatments were respectively: 70%, 74%, 49% and 41%. The rates of morule were: 34%, 38%, 24% and 17,6% and for blastocyst were 21%, 21%, 13% e 9%. For the atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> in air at 39° C and 100% humidity the rates of clivage in the four treatments were respectively: 38%, 34,5%, 30,4% and 21,5%. The rates of morule were: 20,4%, 18,3%, 14,6% and 11% and for blastocyst were: 12,4%, 11%, 8,6% and 6%. This results showed that the addition of low concentration of HEPES to the culture media did not negative influence for blastocyst formation. The pH stability obtained in these conditions didn't damage embryonic developmental and may be beneficial for embryo quality during cleavage rates evaluation and feeding when embryos were exposed to ambient atmosphere. However it is necessary to re-enforce the need of

improvement of culture media formulations used in defined systems; especially concerning buffer addition; aiming more stable condition during embryo manipulation in IVP protocols. Those adaptations may result in better embryo viability for future technics application such as embryo freezing and vitrification.

**Key words:** *in vitro production, bovine embryos, culture, buffer system, gaseous atmosphere.*

## **1 INTRODUÇÃO**

Na era globalizada do período em que vivemos existe uma palavra de ordem em todos os setores de geração de produtos e serviços: Produção. Este termo mobiliza grupos na área econômica, tecnológica, administrativa e ecológica e faz com que todas as atividades desenvolvidas nestes setores focalizem a consequência da produtividade aplicada com coerência: desenvolvimento sustentável.

A competitividade exigida no mundo de hoje converge para a geração de qualidade em todos os seguimentos em que a palavra produção e seu amplo significado pode ser inserida. A qualidade proveniente do melhoramento genético dos animais de linhagem superior, a qualidade da carne disponível para o consumo da população em geral, a qualidade dos serviços prestados nos laboratórios de manipulação de produtos de origem biológica e a qualidade embrionária, impulsionam a crescente difusão do conhecimento das biotécnicas associadas.

A Produção *in vitro* de embriões (PIV), revolucionou os conceitos reprodutivos instituídos nas décadas de 50 a 70 e conquistou grande espaço junto à comunidade científica. Desde então, vêm crescendo e contribuindo com o melhoramento de indivíduos das várias raças e diversas espécies existentes.

Este trabalho explora uma idéia que surgiu dos conceitos básicos da Embriologia e da Química e que ainda não estão totalmente esclarecidos e

teve como anseio geral melhorar a qualidade dos meios de cultivo embrionário.

O desenvolvimento de um meio de cultivo *in vitro* completo que atenda a todas as necessidades do embrião tem sido o objetivo de diversos estudos. A tendência das pesquisas atuais consiste em investigar os fenômenos que contribuem para suportar a maturação e o desenvolvimento de um ovócito com competência para transformar-se em um embrião.

Entretanto, apesar de várias pesquisas apontarem as modificações que ocorrem na fase de maturação ovocitária, como as principais responsáveis pelas características formadoras do embrião, este processo também é o resultado da conexão e interação de muitos outros fatores (STOJKOVIC et al., 1999). Após a retirada dos ovócitos dos folículos inicia-se o processo de maturação, que não é controlável até o momento de ocorrência da fecundação *in vitro* e este fato tem grande influência na produção *in vitro* dos embriões (LONERGAN et al., 2003a).

Está bem estabelecido que o metabolismo embrionário, a clivagem e a taxa de prenhez são influenciados pela composição dos meios, por isso esta variável pode acarretar queda da capacidade de desenvolvimento embrionário (ECKERT et al., 1998; MACKLON et al., 2002).

A etapa de cultivo dos embriões produzidos *in vitro* também é crítica porque é nesta fase que a exigência nutritiva e metabólica aumenta de acordo com o número de células embrionárias. Este metabolismo é importante para a formação de embriões com qualidade suficiente para

resistirem aos danos celulares que eventualmente serão provocados pela criopreservação (AGCA et al., 2000).

É sabido que as soluções tampão mais utilizadas no controle de reações químicas ainda são pouco estudadas no contexto do desenvolvimento embrionário. Sabe-se que a presença do bicarbonato de sódio é essencial para que se estabeleça o sistema de regulação de pH, mas as proporções necessárias para que este elemento possa desenvolver sua capacidade tamponante em associação com os outros constituintes dos meios de cultivo embrionário ainda não estão bem estabelecidas.

Para a produção embrionária *in vitro* ser relacionada com os fenômenos que ocorrem *in vivo* é preciso trabalhar com um intervalo de pH fisiológico de  $7.3 - 7.5 \pm 0.1$  (GORDON, 1994). No entanto, a presença do bicarbonato de sódio e sua interação com as condições de temperatura e atmosfera gasosa ainda exigem uma incubadora com controle atmosférico de  $O_2$  e  $CO_2$ , pois nenhum desses agentes tamponantes fornece estabilidade suficiente para a manutenção do desenvolvimento embrionário em condições atmosféricas (QUINN, 2004).

Nenhum componente utilizado com a função de agente tamponante agrega algum valor nutricional aos meios de cultivo e além disso, podem ser tóxicos para as células e/ou embriões se forem acrescentados em concentrações maiores que 50mM (GESHI et al., 1999).

Portanto, as mudanças de pH ficam dependentes das formulações dos meios de cultivo, que ainda variam de acordo com os muitos protocolos utilizados e com as exigências particulares às diferentes

espécies. Substratos energéticos como piruvato, lactato, citrato de sódio e aminoácidos têm atuação de destaque no início do desenvolvimento do embrião, enquanto que a glicose é metabolizada, principalmente, nos estágios de mórula e blastocisto, destacando-se na síntese protéica do blastocisto (DONNAY et al., 2002).

O metabolismo começa a aumentar logo após a ativação do genoma embrionário, ocorrendo uma elevação considerável da adenosina trifosfato (ATP) produzida pela glicólise. Já os aminoácidos são considerados fundamentais para a formação do blastocisto e também servem como substrato energético e regulador de pH, com importantes funções na síntese de proteínas e controle da osmolaridade intracelular (ROSENKRANS & FIRST, 1994).

Apesar de parecer simples de ser controlado, o pH das soluções e do fluido celular é um fator determinante para a eficiência de muitas reações bioquímicas que envolvem equilíbrios ácido-base, influenciando a viabilidade e o crescimento de organismos e tecidos. Além disso, o pH também exerce grande influência no crescimento de células de mamíferos e na qualidade dos blastocistos (LONERGAN et al., 2003b).

Os meios de cultivo para o desenvolvimento embrionário são adaptados para manter os mesmos valores de pH sob uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar pelo ajuste da concentração de bicarbonato de sódio, mas essa relação previamente estabelecida para o pH tem sido questionada nos últimos anos. Isto pode ser explicado devido a uma variação muito rápida de pH durante as manipulações indicando a pouca

estabilidade deste tampão em contato com o oxigênio (OZAWA et al., 2006).

O pH nos meios de cultivo embrionário e em outros procedimentos de cultivo de tecidos é determinado pela composição do meio e pela concentração de CO<sub>2</sub> na atmosfera de cultivo (GILARDI et al., 2004). O principal componente do meio de cultivo que interage com o CO<sub>2</sub> é a solução tampão, que consiste em um tipo de mistura de eletrólitos fracos em meio aquoso apresentando como característica resistência à variação de acidez pela adição de ácidos ou bases, sofrendo também pouca alteração de pH (BAVISTER, 1992; GARDNER & LANE, 2001).

Alguns trabalhos têm estabelecido menores variações na concentração de CO<sub>2</sub> para a atmosfera de cultivo com a utilização de 6% ao invés de 5% de CO<sub>2</sub> (QUINN & COOKE, 2004), ou maiores variações através da utilização de 20% de CO<sub>2</sub> ao invés de 5% de CO<sub>2</sub> (LANE et al., 2003) demonstrando que os resultados obtidos são dependentes da formulação dos meios utilizados.

Com o intuito de facilitar a metodologia de trabalho, soluções mais simples têm sido desenvolvidas. Em geral, são meios com constituições diversas de sais associados a elementos nutritivos, que ainda estão sendo aperfeiçoadas. A base de sua composição é uma solução salina suplementada com substratos que incluem proteínas, uma fonte de energia (piruvato, glicose ou lactose), além de vitaminas e aminoácidos em diversas concentrações (QUINN, 2003).

Dentre alguns meios simplificados, mais utilizados que dispensam o co-cultivo celular estão o CR-1aa (ROSENKRANS & FIRST, 1994), CZB (CHATOT et al., 1989), HECM (SCHINI & BAVISTER, 1988), KSOM (ERBACH et al., 1994), SOF (TERVIT et al., 1972) e SOFaa (GARDNER et al., 1994).

Apesar das soluções para cultivo embrionário serem amplamente utilizadas, poucos trabalhos tratam especificamente do comportamento dos agentes tamponantes nestas soluções. Seu mecanismo de ação, bem como as variações de pH intra e extra celular que eles provocam e que ainda não estão totalmente esclarecidas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes sistemas de tamponamento para os meios de cultivo comparando-os entre si quanto à capacidade de proporcionarem maior estabilidade de pH durante as manipulações efetuadas na etapa do cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro* e testar esses meios modificados quanto aos índices de desenvolvimento embrionário em duas atmosferas gasosas.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Produção *in vitro* de embriões (PIV)**

Muitos fatores contribuíram com a evolução das tecnologias reprodutivas (ART) no decorrer dos últimos 25 anos. Dentre algumas conquistas estão as mudanças nos fármacos e protocolos utilizados para o controle da hiperestimulação ovariana, métodos de recuperação dos ovócitos e coleta de embriões, além dos procedimentos que englobam a

utilização de micromanipuladores como a injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) e a transferência de gameta intrafalopiana (GIFT) (QUINN, 2004).

Na produção *in vitro* de embriões, passou-se a incrementar as soluções salinas básicas, a partir de 1980, com a adição de substratos energéticos, complexos de aminoácidos, vitaminas e precursores dos ácidos nucléicos. Com a utilização dos aminoácidos essenciais e não-essenciais associados às vitaminas na fase de pós-compactação e pré-implantação embrionária, a partir dos anos 90 (POOL, 2002) houve a consolidação da PIV, por permitir a obtenção de resultados constantes.

Nos dias de hoje o bloqueio embrionário ainda é o principal responsável pela diminuição dos resultados obtidos na produção *in vitro* de embriões. O momento do bloqueio embrionário é variável de acordo com a espécie e normalmente ocorre no estágio de 2 células em camundongos, 4 células em humanos e suínos, 8 células em bovinos e ovinos e 16 células em coelhos (TELFORD et al., 1990; BARNES & FIRST, 1991; SCHULTZ, 1993; DE SOUZA et al., 1998; WRIGHT & BONDIOLI, 1981; EYESTONE & FIRST, 1991).

Geralmente, em embriões bovinos produzidos *in vitro*, as falhas nas taxas de desenvolvimento são associadas aos fatores intrínsecos do ovócito que conduzem ao bloqueio e conseqüente degeneração embrionária (LONERGAN et al., 2003a).

Existem diferenças bioquímicas e morfológicas entre embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*. Algumas diferenças como a frouxa

aglomeração das células embrionárias nas mórulas derivadas da PIV, alterações na expressão de alguns genes (KHOSLA et al., 2001; RIPAMONTE et al., 2005), a presença de um número maior de gotas de lipídeos nesses embriões (ABE et al., 2002) influenciam sua viabilidade durante e após o cultivo, sendo que muitas destas diferenças são conseqüentes do tipo de sistema de produção *in vitro* adotado.

Grande atenção tem sido dada aos componentes adicionados aos meios de cultivo *in vitro*, pois a obtenção de bons resultados está diretamente relacionada à habilidade de se mimetizar as condições do micro-ambiente do trato reprodutivo feminino (VANROOSE et al., 2001).

Por outro lado, apesar do progresso conquistado com as descobertas efetuadas a partir dos anos 90, ainda busca-se encontrar um ambiente bioquímico que combine melhores condições de cultivo com os fatores endógenos, reservas de RNAs e proteínas do embrião para proporcionar o desenvolvimento embrionário ideal (MENÉZO et al., 1998 e MENÉZO, 2006).

O espermatozóide tem importância na PIV e após a descoberta da heparina como fator capacitante para o espermatozóide bovino (PARRISH et al., 1988) a etapa de fertilização tornou-se dependente dos fenômenos que a antecedem e interagem com a maturação ovocitária associados aos fatores extrínsecos como íons orgânicos, tampões, composição atmosférica gasosa, aminoácidos, fatores de crescimento, vitaminas, proteínas e macromoléculas (RIEGER et al., 1992) presentes nos sistemas de cultivo embrionário.

O progresso obtido pela PIV a partir dos anos 90 fez com que os eventos envolvendo o gameta masculino voltassem a despertar o interesse dos pesquisadores.

Os avanços obtidos com as Biotécnicas Reprodutivas ao longo dos últimos anos permitiram uma maior participação da fêmea bovina no processo de melhoramento genético do rebanho. O número de descendentes deixados por uma única fêmea ao longo de sua vida reprodutiva aumentou significativamente com o aperfeiçoamento das técnicas de transferência, produção *in vitro* de embriões e com os sistemas de cultivo *in vitro* que continuam a contribuir com o avanço de outras biotécnicas como a clonagem e a manipulação de genes em diversas espécies (GONÇALVES et al., 2007).

A PIV é uma técnica de reprodução assistida (ART) que concentra suas teorias nos processos *in vitro* para auxiliar a pesquisa científica e também associa-se a várias outras linhas de pesquisa na área tecnológica buscando dar suporte a linha de produção animal através de sistemas viáveis para o cultivo embrionário. Apesar das conquistas nas últimas décadas, ainda há muito para ser pesquisado em consequência de alguns procedimentos que necessitam ser aprimorados com o intuito de contribuir cada vez mais com os resultados.

## **2.2 Maturação ovocitária**

Muitas pesquisas estão sendo realizadas a respeito das modificações estruturais que os ovócitos sofrem no início de seu desenvolvimento. No

sistema de Produção *in vitro* de embriões (PIV) é atribuída à etapa de maturação *in vitro* (MIV), grande responsabilidade para a obtenção do sucesso ou insucesso dos resultados.

Basicamente, a parada da maturação meiótica é verificada pela quebra da vesícula germinativa, seguida pela condensação da cromatina e reorganização dos microtúbulos. Esses eventos levam à formação do fuso metafásico que completa a primeira divisão meiótica, após a qual os ovócitos entram na meiose II e interrompem a divisão no estágio de metafase II, até o momento da fertilização (FAN & SUN, 2004).

Dentre os eventos que participam da maturação do ovócito existem ainda as características de variação individual, qualidade intrínseca do ovócito e diferenças no genótipo mitocondrial associadas às condições de adaptação regional que ocorreram durante a evolução das espécies bovinas e provavelmente são fatores que também afetam a produção de blastocistos (MEIRELLES et al., 2001).

Em geral, o potencial de desenvolvimento embrionário está associado a essas características intrínsecas como o folículo de origem, morfologia, cinética das primeiras clivagens (MEIRELLES et al., 2004), além das interações com os sistemas de cultivo.

O conjunto de características implícito na etapa da maturação dos ovócitos é amplo (AGCA et al., 2000). Com base na morfologia ovocitária é possível relacionar dois fundamentos: O fator hormonal que recebe influência direta da secreção de FSH e o fator estrutural que fica sob influência da distribuição e/ou reorganização mitocondrial associada aos

diferentes níveis de ATP nas diferentes categorias morfológicas de ovócitos.

A coleta de ovários oriundos de abatedouros, não permite o controle de todos os fatores epigenéticos que interferem na formação do blastocisto desde a retirada do ovócito do interior do folículo, mas ainda consiste no procedimento mais prático e rápido para obtenção de material para pesquisa. A conexão dos fatores hormonais que ocorrem *in vivo*, principalmente no período da ovulação, com as condições ideais de maturação *in vitro* ainda constitui o foco de diversos estudos que tentam explicar o mecanismo através do qual o ovócito bovino pode adquirir a competência para ser fecundado, e que essa competência já ocorreria antes da quebra da vesícula germinativa (SIRARD et al., 2007).

O FSH é bastante utilizado nos protocolos de maturação *in vitro* para aumentar a qualidade do ovócito (ALI & SIRARD, 2005), por contribuir com os eventos de fertilização e desenvolvimento embrionário inicial, além de sua ação na expansão das células do *cumulus* (CALDER et al., 2003). Estas células também são influenciadas por alguns fatores secretados pelo ovócito que são membros da família TGF- $\beta$ . Recentemente a proteína de crescimento e diferenciação, fator-9 e a proteína morfogenética do osso, fator 15 foram identificadas como fatores sinalizadores parácrinos, expressos exclusivamente nos ovários e envolvidos com as funções de regulação das células do *cumulus* e/ou da granulosa sendo considerados essenciais para o sucesso da ovulação, fertilização e desenvolvimento folicular na reprodução em mulheres

(ELVIN et al., 1999) camundongos (GUERPEL et al., 2006) e em bovinos (HUSSEIN et al., 2006).

A ação do FSH é atingida através de mensageiros secundários como as cAMP (adenosina 30–50 monofosfato), proteína quinase A (PKA) (IZADYAR et al., 1998) e/ou proteína quinase C (PKC) (ROSE-HELLEKANT & BAVISTER, 1996; FAN et al., 2004). Esta importante ação específica no processo de maturação das células do *cumulus* ou células da granulosa difere da função que este hormônio desempenha durante a foliculogênese (SIRARD et al., 2007).

No plano estrutural, a distribuição e/ou reorganização mitocondrial está associada aos níveis de ATP nas diferentes categorias de ovócitos (HENGARTNER, 2000) e pode ser relacionada às características morfológicas dos ovócitos classificados como bons e dos ovócitos classificados como pobres. Esta é uma variável responsável pelos diferentes graus de desenvolvimento observados de acordo com a capacidade individual de cada ovócito após a fertilização (STOJKOVIC et al., 2001).

A maturação mitocondrial, produção de ATP e acúmulo de energia durante a ovogênese são eventos cruciais nos processos de ativação, fertilização e possível desenvolvimento do ovócito (THOMPSON et al., 2000). Através de comparações entre critérios morfológicos com a distribuição mitocondrial e reserva de ATP antes e após a maturação, foi possível estabelecer que a atividade metabólica é determinante para o desenvolvimento potencial dos embriões, sendo que ovócitos com

reduzido conteúdo de ATP podem desenvolver-se mais lentamente produzindo embriões de menor qualidade e com número de células reduzido (STOJKOVIC et al., 2001).

A perda de atividade do sistema de ponto de verificação (*checkpoint system*) no ciclo celular também prejudica o desenvolvimento embrionário. O influxo de cálcio é responsável pela regulação desse sistema e está presente na fisiologia do ovócito a partir da ovogênese até a maturação e fertilização do ovócito (TOSTI, 2006). A parada do sistema de ponto de verificação induz alterações ainda não identificadas nos ovócitos mamíferos especificamente em estágio de Metáfase II, com conseqüências degenerativas. Fatores endógenos e exógenos não detectados podem adicionalmente estar participando no processo que controla a meiose ou ativação da metáfase II no ovócito.

O esclarecimento desses parâmetros que sinalizam o controle da meiose é necessário para elucidarmos a regulação da maturação do ovócito e do ciclo celular (STOJKOVIC et al., 1999). Ainda existem os aspectos relacionados ao aprimoramento da maturação citoplasmática *in vitro*, também com o intuito de melhorar a capacidade de desenvolvimento embrionário de ovócitos provenientes de folículos antrais pequenos. Neste grupo destacam-se os fatores de crescimento produzidos pelas células foliculares durante o desenvolvimento folicular tais como, fator-I de crescimento semelhante à insulina ou IGF-I (STEFANELLO et al., 2006), fator de crescimento epidermal - VEGF (EINSPANIER et al., 2002) e fator de crescimento fibroblástico - FGF, que já foram testados durante

a maturação *in vitro* (MIV), além dos ativadores biológicos do ácido hialurônico mediados através da ligação a receptores para o ácido hialurônico como as CD44 (KIMURA et al., 2007) e os RHAMM/IHABP (STOJKOVIC et al., 2003).

### **2.3 Meios de cultivo embrionário**

Os meios de cultivo têm um papel determinante para o condicionamento e viabilidade do embrião (TEOTIA et al., 2001). Uma variedade de fatores extrínsecos como íons orgânicos, tampões, composição atmosférica gasosa, aminoácidos, fatores de crescimento, vitaminas, proteínas e macromoléculas desconhecidas podem afetar a viabilidade embrionária (RIEGER et al., 2002).

Recentemente, estudos sobre a fisiologia e metabolismo levaram ao uso de meios mais próximos às necessidades dos embriões. O aperfeiçoamento das composições citadas na literatura, inclui modificações em seu conteúdo, entre as quais o seu enriquecimento com carboidratos e aminoácidos responsável pela elevação das taxas de formação de blastocisto em níveis superiores a 50% no quinto dia de desenvolvimento e a elevação das taxas de implantação a níveis superiores a 40% (GARDNER et al., 1998).

O uso de sistemas tampões em meios de cultivo é necessário para minimizar possíveis flutuações de pH em decorrência das variações do pH do meio refletirem no citosol do ovócito e das células embrionárias. Portanto qualquer oscilação de pH no meio de cultivo poderá afetar a

viabilidade celular resultando em baixos índices de fecundação e produção de blastocistos.

Os primeiros tampões estudados foram misturas de sais inorgânicos tamponados com grandes quantidades de fosfato ou bicarbonato de sódio (LENINGHER, 1995). Existem limitações funcionais para o tampão bicarbonato de sódio quanto à sua capacidade de manutenção do pH constante. É necessário a utilização de um sistema fechado, equilibrado por níveis de CO<sub>2</sub> na fase gasosa porque a perda de CO<sub>2</sub> pela solução pode levar à conseqüente e progressiva elevação do pH.

Os tampões causam alguns efeitos biológicos indesejáveis como estímulo ou depressão da atividade enzimática, além de poderem interferir ou reagir com substratos como inibidores, devido a força iônica, por isso não devem ser adicionados em altas concentrações e devem possuir máxima solubilidade em água (SKOOG, 2003).

De acordo com Rizos (2003), nenhuma melhoria na qualidade dos blastocistos tem sido verificada com as modificações propostas nos meios de cultivo até então, o que exige mais pesquisa sobre o assunto. Ainda não existem condições ideais de cultivo para a produção de embriões *in vitro* que simulem a eficiência verificada *in vivo* e esse também é um dos motivos que retarda a obtenção de bons resultados.

As condições de cultura que ainda não são ideais, têm sido responsabilizadas pelas taxas insatisfatórias de implantação e prenhez (MENÉZO et al., 1999) apesar do progresso conquistado com o crescimento da PIV após a implantação de laboratórios comerciais

distribuídos em diversas regiões do mundo que auxiliam as pesquisas e agilizam a difusão do conhecimento, contribuindo com os níveis superiores de aperfeiçoamento da técnica e conseqüente melhoria dos resultados.

É difícil quantificar morfologicamente os efeitos deletérios que os meios de cultura exercem sobre os embriões. Na tentativa de garantir bons resultados quanto a viabilidade embrionária e para a obtenção de prenhez, alguns autores mantêm a idéia de que a sincronização do embrião com o trato feminino é um fator determinante (GARDNER & LANE, 1997). Outros grupos de pesquisa associam os resultados de viabilidade à manutenção dos sistemas de co-cultivo por acreditarem que as células somáticas modificam o meio de cultura de uma maneira consistente com a fisiologia do embrião (ALMODIN, 2001).

Os sistemas de co-cultura alteram o meio, seja pela secreção de substâncias importantes ao desenvolvimento do embrião, como pela extração de impurezas ou redução de níveis de nutrientes do meio. Esta redução pode ser inclusive nos níveis de glicose, o que é consistente com a teoria do uso dos meios seqüenciais. Mas um detalhe importante é que estas células têm sido utilizadas mesmo durante o período pós-compactação quando a necessidade de glicose parece ser maior. Os tipos celulares mais utilizados são as células Vero (células renais de macaco verde), BOEC (células epiteliais de oviduto bovino) e oviduto humano (WIEMER et al, 1993; FONG & BONGSO, 1999), BRL (células do fígado de rato e de búfalo) (BEKER et al., 2002), ou fibroblastos uterinos bovinos

(WIEMER et al., 1989) que parecem ter o mesmo efeito quanto a melhorar o desenvolvimento do embrião.

Com o advento dos meios de cultura seqüenciais livres de soro, utilizados com maior freqüência na reprodução humana têm-se conseguido bons resultados para o cultivo do zigoto até a fase de blastocisto.

Apesar dos óvulos humanos serem maturados *in vivo*, a opção por sistemas mais simples com ausência do co-cultivo oferecem resultados compatíveis, além de facilitarem a prática diária das manipulações em série, isentarem os indivíduos de riscos atribuídos à transmissão de doenças e contribuírem com as tentativas de melhorar os resultados (ALMODIN et al., 2001).

Estudos recentes sobre a fisiologia e o metabolismo do embrião visam a utilização de protocolos de PIV com uso de meios cada vez mais próximos às necessidades dos embriões até o estágio em que se deseja trabalhar. A implantação de um sistema artificial de manutenção e desenvolvimento embrionário que elabore um ambiente compatível com o fisiológico e assegure qualidade embrionária *in vitro* comparável à verificada *in vivo* ainda constitui o anseio de diversos grupos que pesquisam nesta área.

## **2.4 Mecanismo de ação dos sistemas tampões utilizados na Produção *in vitro* de embriões.**

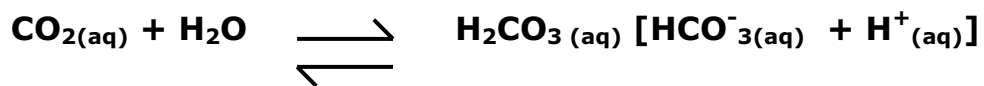
Os tampões biológicos são soluções que evitam variações de pH em ambientes não fisiológicos ou artificiais. Não impedem que as variações ocorram, mas podem minimizá-las. Normalmente são formadas por um ácido fraco e um sal do mesmo ácido fraco obtido com uma base forte (ROLLIE & BRUCE, 2002).

A principal característica do tampão no meio de cultivo é criar um ambiente definido para as biomoléculas, propiciando que fiquem estáveis em sua forma ativa. O tampão não pode influenciar a composição dos meios nem comprometer a sua qualidade, ou conter agentes que comprometam a estabilidade dos reagentes (SKOOG, 2003).

Um fator importante para que se obtenha bons resultados na PIV, com relação à quantidade e qualidade dos embriões, é a menor amplitude de variação que um tampão biológico eficaz deve manter sendo o pH ideal compreendido entre 7,3 a 7,5 (DOWNS & MASTROPOLO, 1997; VAJTA et al., 1997). Alterações para valores ácidos são particularmente prováveis tendo em vista a variação na produção metabólica celular de ácidos como o láctico e pirúvico que se estiverem presentes nas formulações dos meios, podem abaixar o pH até valores inferiores a 7.0.

Na produção *in vitro* de embriões, os meios são produzidos para proporcionar o cultivo embrionário em uma atmosfera com presença de CO<sub>2</sub>. O sistema H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, criado nesta atmosfera promove a dissolução de 1% do dióxido de carbono gasoso em água fazendo com que haja a

formação do ácido carbônico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) como mostra a reação de equilíbrio abaixo:



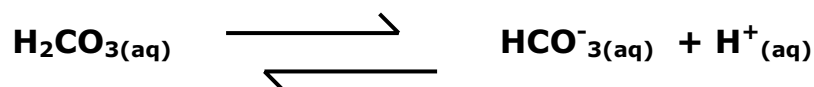
Portanto, a adição de  $\text{CO}_2$  à água produz uma solução ácida e o 1% de  $\text{CO}_2$  dissolvido associado ao ácido carbônico constituem um sistema tampão. O deslocamento da reação é feito pelo dióxido de carbono presente nesta atmosfera. Quando há falta de  $\text{H}^+$ , doa prótons ao meio. Quando há excesso de  $\text{H}^+$  capta prótons do meio (SKOOG, 2003).

Os tampões biológicos orgânicos mais eficientes em meios para cultivo embrionário são o bicarbonato de sódio, fosfato de sódio e HEPES. O sistema fosfato é o tampão que atua principalmente a nível celular e é formado por dois sais: monohidrogeno fosfato de sódio ou  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - fosfato de sódio dibásico e dihidrogeno fosfato de sódio  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$  - fosfato de sódio monobásico. Este último funciona como ácido e tampona as bases (RUSSEL, 1994).

O aumento da concentração do fosfato de sódio dibásico diminui o valor de pH porque ele é o responsável pela liberação de íons  $\text{H}^+$  para a solução. Esses íons se ligam a molécula de água formando o íon hidrônio ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) que acarreta aumento de acidez ou diminuição de pH. O aumento da concentração de fosfato de sódio monobásico aumenta o valor de pH porque ele é o responsável pela retirada de íons  $\text{H}^+$  da solução. Com a diminuição de hidrônio no meio, haverá diminuição de acidez ou aumento de pH (RUSSEL, 1994).

O sistema bicarbonato/ácido carbônico é o mais importante para evitar variações de pH produzidas por ácidos não-voláteis. É composto por ácido carbônico e bicarbonato de sódio e atua através de uma reação de hidrólise. Quando o bicarbonato de sódio ( $\text{H}_2\text{CO}_3^+$ ) entra em contato com a água, ocorre a produção de ácido carbônico com liberação de íons hidroxila, ocorre a absorção de prótons tornando o meio alcalino ou o pH básico (ROLLIE & BRUCE, 2002).

Essa mistura em contato com o ar atmosférico faz com que haja deslocamento da reação com produção de íons  $\text{H}^+$ , acarretando diminuição de pH, através da reação abaixo:



O HEPES (*N*-(2-hidroxietil) piperazina-*N'*-(2-ácido etanosulfônico) já é utilizado por vários laboratórios no meio de maturação (GOOD et al., 1966; DOWNS & MASTROPOLO, 1997). No cultivo de embriões bovinos, o HEPES foi utilizado na concentração de 12mM no meio TCM-199 (GOTO et al., 1992), no meio SOF na concentração de 25mM (KESKINTEPE et al., 1995) e na concentração de 25mM em TCM-199 para a etapa da maturação e de 12,5mM e 25mM, respectivamente, para a etapa do cultivo (MONTAGNER et al., 2000).

Seu mecanismo de ação não é isolado, por ser um componente fabricado através da associação de vários elementos. Existem controvérsias quanto ao efeito que é capaz de provocar na PIV, pois há

trabalhos que demonstram que ele não exerce efeito positivo, ou é até deletério quando utilizado na concentração de 25mM (BAGGER et al., 1987; KESKINTEPE & BRACKETT, 1996) enquanto outros relatam efeito positivo nas mesmas concentrações (GOTO et al., 1992; KATO & SEIDEL, 1995; POLLARD et al., 1995; MONTAGNER et al., 2000).

## **2.5 Atmosfera gasosa**

As dificuldades relativas à compreensão das necessidades nutricionais e as limitações impostas pelas características físico-químicas dos meios utilizados consistem em barreiras técnicas à PIV desde o século XIX. No início do século XX, juntamente com o desenvolvimento da Química, a Embriologia conquistou progressos significativos com resultados positivos na coleta e cultivo de embriões (BRACKETT et al. , 1982).

Wesley Whitten, na década de 50, propôs uma nova formulação para os meios de cultura que passaria a ser utilizada tanto na coleta quanto no cultivo dos embriões ampliando significativamente o número de embriões implantados com sucesso (CHANG, 1959). Whitten desenvolveu um meio utilizando uma solução de Krebs-Ringer bicarbonato, suplementada com albumina sérica bovina, o qual foi capaz de promover as clivagens de embrião de camundongo com uma célula até o estágio de blastocisto (STEPTOE & EDWARDS, 1978).

Desde os primeiros estudos, os meios para cultivo embrionário foram formulados para manterem um pH estável em torno de  $7.3$  a  $7.5 \pm 0.1$  (GORDON, 1994). O pH desses meios de cultivo é dependente de uma

atmosfera gasosa e pode ser alterado pelas oscilações nas concentrações de CO<sub>2</sub> (MORTIMER & QUINN, 1996) ou de bicarbonato de sódio – NaHCO<sub>3</sub> (CARNEY & BAVISTER, 1987) e também pela adição de um ácido ou base, como o ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (BAVISTER, 2000).

A necessidade da utilização de uma tensão de oxigênio reduzida, quando o cultivo é efetuado na ausência de células somáticas foi confirmada pelo baixo desenvolvimento embrionário após o cultivo de zigotos ovinos fecundados *in vitro*, no meio SOF, com atmosfera contendo 20% O<sub>2</sub> ao invés de 5% O<sub>2</sub> (WATSON et al., 1994).

Além disso, o desenvolvimento é mais rápido para os zigotos bovinos e ovinos cultivados em SOF sob tensão reduzida de oxigênio, em comparação aos zigotos cultivados sob alta tensão de oxigênio, independentemente da presença ou não de células do oviduto (BERNARDI et al., 1996).

Os componentes do meio de cultivo podem influenciar a velocidade de desenvolvimento e/ou a sobrevivência dos embriões porque interagem diretamente com seu metabolismo, sendo que todas as considerações sobre as formulações dessas soluções foram designadas para proporcionar a maturação do ovócito antes da fertilização e a evolução do zigoto até estágios iniciais. Até então, nenhum meio foi testado para produzir blastocisto (YADAV, 1993; GARDNER & LANE, 2001; GUERIF et al., 2007).

Com a intenção de se produzir embriões até estágios mais avançados de desenvolvimento, surgiram os meios seqüenciais e/ou meios quimicamente definidos e/ou simplificados por dispensarem o co-

cultivo celular e serem sistema de cultura livres de soro. Desde então a atmosfera gasosa passou a ser fixada em 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub> e os requerimentos nas concentrações de aminoácidos e carboidratos foram alterados (TERVIT et al., 1972).

Paralelo ao crescimento das Biotécnicas associadas à PIV, e à necessidade de expansão dos procedimentos e produtos interligados às conquistas comerciais que ocorreram no mercado de produção animal nos últimos anos, houve o início da fabricação de meios de cultivo nacionais. Esses produtos ainda necessitam de aperfeiçoamento quanto às especificações sobre as concentrações de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> sob as quais suas formulações devem ser submetidas e as variações fisiológicas da espécie do embrião em que serão utilizados, para garantirem resultados satisfatórios.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

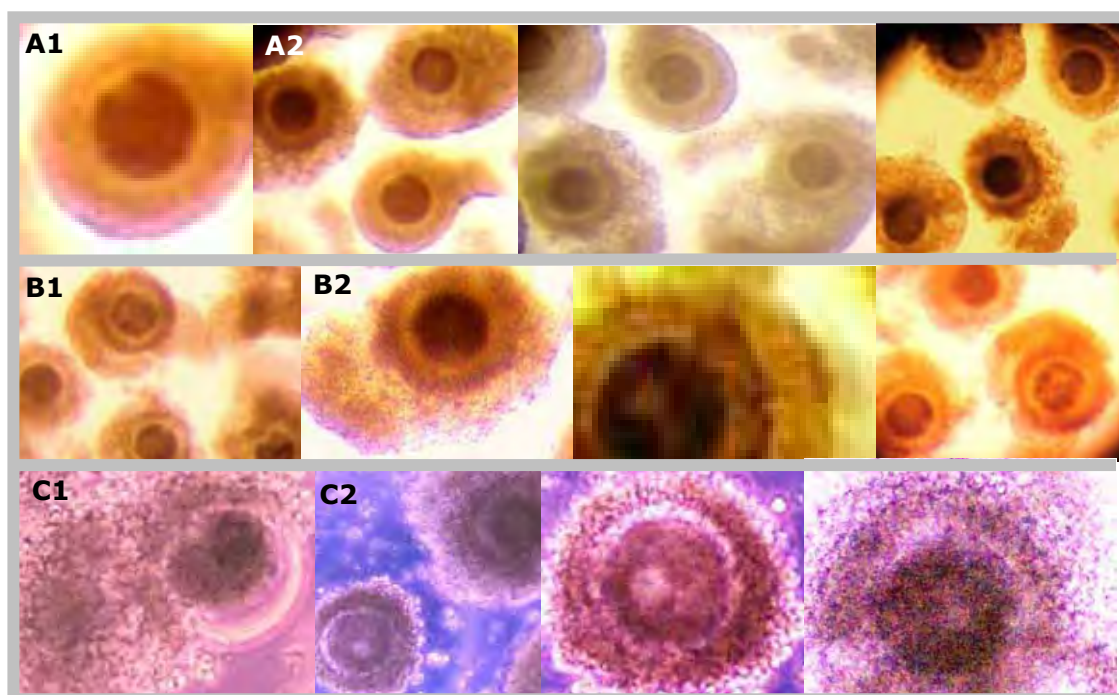
#### **3.1 Coleta dos ovários e seleção dos ovócitos**

Os ovócitos foram obtidos a partir de ovários provenientes de frigorífico no período de junho a julho de 2006 e março a julho de 2007 e foram transportados em recipiente térmico, conservados entre 30 e 35°C, contendo solução fisiológica de 0,9% de NaCl acrescida de 100 mg de estreptomicina (SIGMA®), e 50.000 UI de penicilina G-Potássica (SIGMA®), para 1 litro de solução em tempo não superior a duas horas após abate. No laboratório, os ovários foram lavados inicialmente em solução

fisiológica, e em seguida, colocados em recipientes de vidro. Os ovócitos foram obtidos através de punção folicular, manualmente, com auxílio de uma seringa de 10mL acoplada a uma agulha 32x17. Após a decantação por 20 minutos, ocorreu a procura sob estereomicroscópio (Leica®). Os ovócitos permaneceram em líquido folicular durante o procedimento de seleção ovocitária e os *Complexos Cumuli*-ovócitos encontrados foram transferidos para placas de Petri de 35 mm de diâmetro contendo meio TCM-199 com sais de Hank's (SIGMA®).

### **3.2 Maturação *in vitro* dos ovócitos**

Os *Complexos Cumuli*-ovócitos (CCOs) foram selecionados de acordo com a classificação de Leibfried & First, 1979 como demonstrado na figura 1 e então distribuídos aleatoriamente em gotas de 100µL das placas de Petri de 35 mm de diâmetro em grupo de 20 ovócitos por gota, em meio TCM-199 com sais de Hank's (SIGMA®), acrescido de 10% SFB, 50 µg/mL de gentamicina, 2 mM de piruvato de sódio, 20 mM de HEPES, 0,5 µg/mL de FSH e 0,03 UI/mL de LH sob óleo mineral e permaneceram por 24 horas em estufa de cultivo à temperatura de 39°C, 5% de CO<sub>2</sub> em ar e 100% de umidade relativa do ar.



**Figura 1- Fotomicrografias em estereomicroscópio Leica® A1-** ovócito grau 1 (aum. de 400 x). **A2** - ovócitos classificados como grau 1 (aum. de 100 x); **B1** - ovócitos classificados como grau 2 (aum. de 100 x). **B2** - ovócitos classificados como grau 2 (aum. de 200 x e 400 x). **C1** - ovócitos classificados como grau 3 (aum. de 100 x). **C2** - ovócitos classificados como grau 3 (aum. de 200 x e 400 x).

### **3.3 Coloração dos ovócitos para avaliação da Maturação Nuclear**

Com intuito de verificar se os ovócitos submetidos à fertilização estavam maduros, a maturação nuclear foi avaliada após 24 horas de incubação dos ovócitos. A partir do material coletado em abatedouro e que foi distribuído aleatoriamente entre aos tratamentos, 10% dos ovócitos foram selecionados em placas separadas onde cada gota da placa

de maturação continha ovócitos correspondentes ao grau de seleção. Como foi adotado um critério de seleção para os ovócitos eles foram divididos em três grupos, sendo o G1 (ovócitos de qualidade 1), G2 (ovócitos de qualidade 2), G3 (ovócitos de qualidade 3 e 4) de acordo com a classificação de Leibfried & First, 1979.

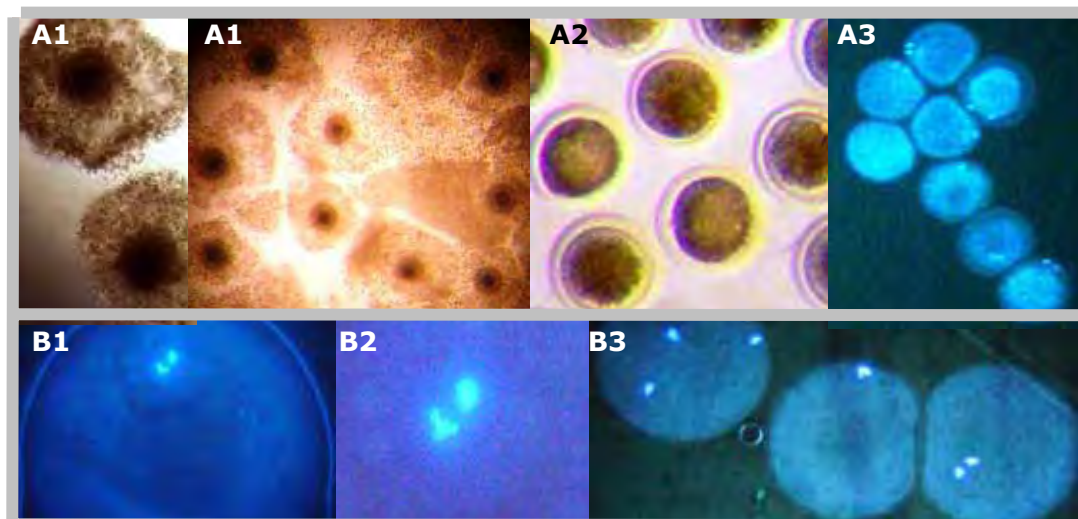
Esses ovócitos foram colocados em gotas de 100  $\mu$ L e decorridas 24 horas, retirados da estufa e mantidos em solução de hialuronidase 0,2% durante 20 minutos, para que as células da granulosa fossem removidas completamente.

Os ovócitos desnudos foram lavados em solução de PBS com 10% de soro fetal e transferidos para as lâminas histológicas para coloração.

O corante Hoeschst 33342 (SIGMA<sup>®</sup>) foi diluído na concentração de 1mg/mL em PBS e glicerol (proporção 1:9) e adicionado aos ovócitos desnudos que foram agrupados em número máximo de oito ovócitos por lâmina sendo que cada lâmina foi coberta com lamínula para possibilitar a avaliação em microscópio invertido Leica<sup>®</sup> DMIRB equipado com luz fluorescente ultravioleta (filtro 350 e 461nm), como demonstrado na figura 2.

Os ovócitos foram classificados de acordo com o estágio de maturação em: VG – vesícula germinativa (ovócito com núcleo definido, com ou sem nucléolo, sem condensação da cromatina); QVG – quebra da vesícula germinativa (ovócito no estágio final da prófase I com condensação de cromatina); MI - Metáfase I (cromossomos condensados formando a placa equatorial); MII – Metáfase II (cromossomos formando

a placa equatorial, com o primeiro corpúsculo polar exteriorizado – figura 2B) e NI/DEG – estrutura não identificada ou degenerada (quando não foi possível identificar o estágio da meiose ou pela presença de vacúolos no ovócito que dificultaram a visualização dos cromossomos).



**Figura 2. Fotomicrografias em estereomicroscópio e microscópio invertido Leica® A1** – ovócitos após 24 horas de maturação (aum. 100 x); **A2** - ovócitos desnudos (aum. 200 x) e **A3**- disposição dos ovócitos corados na lâmina (aum. 100 x) . **B1** – Extrusão do corpúsculo polar (aum. 200 x). **B2** - aumento de 400 x. **B3** – ovócitos em estágio de Metáfase II (aum. de 200 x).

Os ovócitos em Metáfase II com o primeiro corpúsculo polar extruso estavam maduros, como mostra a figura 2B.

### **3.4 Fecundação in vitro dos ovócitos**

Os ovócitos maturados também foram avaliados de forma subjetiva, quanto a expansão do *Cumulus oophorus* sob estereomicroscópio, sendo a seguir lavados e transferidos para as gotas de 90 µL das placas de Petri de 35 mm de diâmetro em grupo de 20 ovócitos por gota, em meio Fert-TALP (a partir de modificações na TYRODE'S *solution*). Para a fecundação foi utilizado sêmen congelado em palhetas de 0,5mL de touros *Bos indicus* (Nelore – Gangster da Santa Marta/NOVA ÍNDIA, Nelore - Marte da SEMBRA e Nelore – RED/BIOTECH). As palhetas com sêmen foram descongeladas em banho-maria a 39°C por 20 segundos e o sêmen foi avaliado quanto aos critérios de viabilidade (motilidade e vigor) e concentração espermática em câmara hematimétrica (INLAB®).

A seleção dos espermatozóides viáveis foi efetuada pelo método do gradiente descontínuo de Percol®(PERTOFT, 2000) diluído para formar a fração 90% e fração 45% e montado em tubo cônico de 15 mL. O conteúdo da palheta foi depositado na superfície do gradiente e o material foi centrifugado por 20 minutos a 1700 rpm. O *pellet* formado foi lavado uma vez em meio TALP – Sperm (a partir de modificações na TYRODE'S *solution*). O *pellet* final foi ressuspenso em meio TALP – Fert suplementado com 3mg/mL de BSA, adicionado dos agentes capacitantes (heparina - 10µg/mL, hipotaurina - 10µM, epinefrina - 1µM e penicilamina - 20µM) em volume suficiente para que a concentração final atingisse aproximadamente  $1 \times 10^6$  espermatozóides/mL.

Foram separadas duas amostras para determinação da concentração e avaliação da motilidade espermática. A concentração foi estimada em câmara hematóimétrica (INLAB<sup>®</sup>), diluindo-se 5 µL do *pellet* em 250µL de água. O sêmen foi depositado nas gotas de 90µL já contendo os ovócitos em meio TALP – Fert, sob óleo mineral. Após a inseminação, os possíveis zigotos permaneceram em estufa durante 20 a 22 horas à temperatura de 39 °C, 5% de CO<sub>2</sub> em ar e 100% de umidade relativa do ar.

### **3.5 Cultivo *in vitro***

Após o período de incubação de 20 a 22 horas, os possíveis zigotos foram cultivados de acordo com os tratamentos propostos. Os possíveis zigotos foram transferidos para poços das placas Nunc<sup>®</sup> contendo 500 µL de meio de cultivo correspondente a cada tratamento e desnudados com auxílio de pipeta até a remoção das células *do Cumulus oophorus*.

Encerrado este procedimento os possíveis zigotos foram transferidos para as gotas de 100µL das placas de Petri de 35 mm de diâmetro sob óleo mineral, de acordo com os tratamentos T1: grupo controle com sistema tampão de 25mM de bicarbonato de sódio dos meios HTF IRVINE Scientific<sup>®</sup> adicionado de lactato de sódio, aminoácidos essenciais e não-essenciais; T2: meio SOF com sistema tampão de 25mM de bicarbonato de sódio adicionado de lactato de sódio, aminoácidos essenciais e não-essenciais; T3: meio SOF com sistema tampão de 9mM de bicarbonato de sódio e 4mM de HEPES (H 6147 SIGMA<sup>®</sup>) adicionado de lactato de sódio,

aminoácidos essenciais e não-essenciais e T4: meio SOF com sistema tampão de 9mM de bicarbonato de sódio e 12mM de fosfato de sódio.

Os possíveis zigotos foram divididos em grupos de 20 por gota e em todos os tratamentos foram adicionados 5% de SFB e 3 mg/mL BSA. Para facilitar a forma de avaliação e submeter todos os meios de cultivo às mesmas condições, e de acordo com o número de ovócitos disponíveis por coleta ovariana foram confeccionadas 4 gotas de 100 $\mu$ L sob óleo mineral contendo os diferentes tratamentos, na mesma placa de Petri de 35 mm de diâmetro.

Como a intenção foi testar também o desenvolvimento embrionário em duas atmosferas gasosas diferentes, os tratamentos foram submetidos de maneira simultânea em estufa à temperatura de 39 °C, 5% de CO<sub>2</sub> , 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub> e em estufa à temperatura de 39 °C, 5% de CO<sub>2</sub> em ar e 100% de umidade relativa.

Os embriões ficaram nas placas sob óleo mineral até a primeira avaliação feita após 24 horas a partir da fertilização (taxa de clivagem), a segunda avaliação feita 72 horas a partir da fertilização (taxa de mórula) que coincidiu de forma programada com o *Feeding*, onde 50% do meio de cada gota foi substituído pelo meio correspondente a cada tratamento, para retirada de substâncias tóxicas e renovação de nutrientes.

Para obtenção das taxas de blastocistos os embriões foram avaliados decorridos 7 e/ou 8 dias de cultivo após a fertilização.

A capacidade dos meios de cultivo embrionário em proporcionar desenvolvimento foi avaliada pelas taxas de clivagem, mórula e blastocisto, nas duas atmosferas gasosas consideradas.

Os parâmetros morfológicos que estabelecem critérios de seleção embrionária e permitem estabelecer o padrão de qualidade embrionária também foram considerados neste experimento.

### **3.6 Elaboração dos meios de cultivo e critérios utilizados para avaliação do pH dos meios preparados**

Os meios TALP - Sperm, TALP – Fert e os meios destinados a etapa do cultivo embrionário foram preparados no laboratório (formulações disponíveis no apêndice do trabalho). A mistura dos reagentes foi efetuada em uma seqüência que evitasse a interferência de um íon sobre outro, seguindo critérios químicos de diluição, como por exemplo evitar que seja feita a mistura direta de um sal contendo íons  $\text{Ca}^{++}$  com outro sal contendo bicarbonato de sódio, para que não haja precipitação do composto carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ).

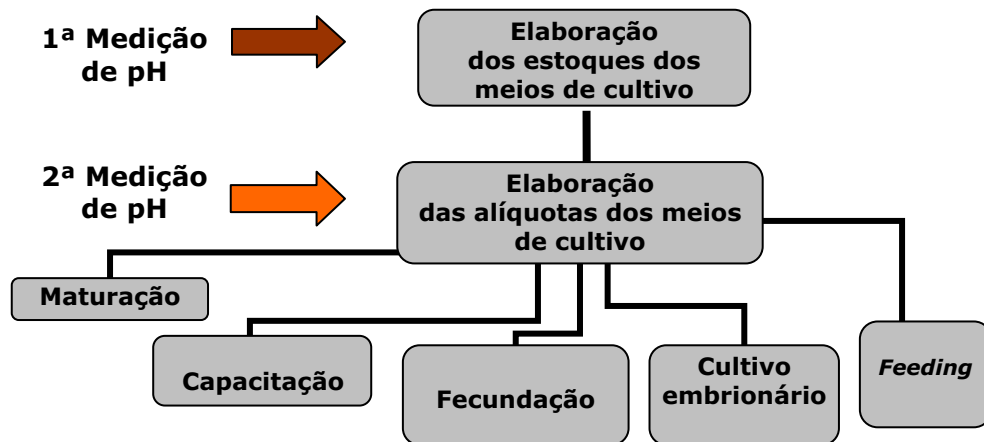
Com intervalos de 15 dias foram preparados volumes de 100mL para cada meio, denominados estoque. Após a confecção dos estoques foi aferido o pH e a osmolaridade. O padrão estabelecido para todas as soluções preparadas foi o valor fisiológico entre 7.3 e 7.5 para pH e 280 a 300mOsm para osmolaridade.

Todos os estoques dos meios foram filtrados em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  e armazenados a temperatura de 5° C. No momento do uso, foram

retiradas alíquotas dos meios destinados a todos os tratamentos da etapa de cultivo embrionário. A essas alíquotas foi adicionado 5% de soro fetal bovino, gentamicina (50  $\mu\text{g/mL}$ ), piruvato (2 mM) e albumina sérica bovina (3mg/mL). Para o meio HTF IRVINE *Scientific*<sup>®</sup> além desses componentes foi adicionado à alíquota glutamina (15 mg/mL), lactato de sódio (1,5mM), aminoácidos essenciais (0.02  $\mu\text{L/mL}$ ) e não-essenciais (0.01  $\mu\text{L/mL}$ ), componentes ausentes na formulação do produto comercializado.

Essas alíquotas permaneceram 1 hora em estufa de cultivo e foram novamente avaliadas quanto aos valores de pH antes da preparação das placas de cultivo. Além das aferições efetuadas no momento da formulação dos estoques e utilização das alíquotas dos meios de cultivo, as variações de pH foram observadas através de mudanças de colorações no intervalo entre 6.8 a 8.2, perceptíveis devido a presença do indicador visual de pH Phenol Red (SIGMA<sup>®</sup>).

### 3.7 Esquema das Medições de pH



### 3.8 Análise Estatística

Para análise dos dados dos Experimentos foi empregado o teste ANOVA e para a comparação múltipla entre as médias dos tratamentos foi efetuado o teste de TuKey-Kramer (NS = 5%), baseando-se nas taxas de clivagem, mórulas e blastocistos. As proporções obtidas nos três estágios de desenvolvimento foram transformadas através da função arco seno ( $\sqrt{p}$ ). O efeito produzido em todos os tratamentos foi dependente do experimento correspondente indicando uma interação significativa (NS= 5%). Para estimar o efeito touro nas taxas de clivagem, mórula e blastocistos foi aplicado o teste Student-Newman-Keuls. Para todas as análises utilizou-se o Software SAS (*Statistical Analysis System*, 9.1.3 version; SAS, 2003).

#### **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O desenvolvimento embrionário em meios quimicamente definidos é um progresso que ainda não foi atingido nos procedimentos laboratoriais que envolvem a Produção *in vitro* de embriões.

A utilização de soro e outros componentes de origem animal como principal constituinte protéico inviabiliza a condição ideal de cultivo e promove o desenvolvimento embrionário com interferência de fontes de diversas origens e em quantidades variadas como hormônios, proteínas, glicoproteínas, fosfatases e quinases constituintes do soro sanguíneo (GONÇALVES et al., 2002).

As modificações sugeridas neste trabalho seguem uma outra proposta que inclui a estabilização dos constituintes presentes nas formulações conhecidas, a partir de alterações no sistema de tamponamento. No tratamento 1 foi utilizado meio de cultivo comercial HTF com 25mM de bicarbonato de sódio, apropriado para garantir o desenvolvimento embrionário até 72 horas após a fertilização. Devido essa característica este meio foi enriquecido com aminoácidos (DEVREKER et al., 2001) para sustentar o desenvolvimento até estágios mais avançados.

No tratamento 2 foi confeccionado no laboratório o meio SOF acrescido de aminoácidos com tampão de 25mM de bicarbonato de sódio e a partir desta formulação os tratamentos 3 e 4 sofreram modificações em seus tampões biológicos. Para o tratamento 3 foi feita a associação com 4mM de HEPES e para o tratamento 4 foi feita a associação com 12mM de

fosfato de sódio. Essa associação de tampões foi efetuada com o intuito de proporcionar maior estabilidade de pH.

O experimento foi desenvolvido em duas atmosferas de cultivo e pôde ser comprovado que a variação na composição gasosa influenciou o desenvolvimento embrionário em todos os tratamentos. As variáveis atmosfera gasosa (comparar os dados das tabelas 2 e 3), meios de cultivo (tabela 2 e tabela 3) e touro (tabela 4) tiveram efeito significativo para as taxas de clivagem, mórulas e blastocistos.

Foi dada importância ao desenvolvimento embrionário desde as clivagens iniciais, a partir das 24 horas após a fertilização. Os possíveis zigotos ficaram condicionados aos diferentes meios de cultivo testados nas duas atmosferas gasosas de 5% de CO<sub>2</sub> com 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> em ar e 100% de umidade relativa do ar.

Os meios de cultivo foram observados quanto à capacidade de estabilização de pH desde as etapas de desnudamento e clivagem (24 horas), passando pela etapa do *Feeding* e avaliação das taxas de mórula (72 horas), chegando ao estágio de blastocisto (7º e/ou 8º dia), fases em que houve exposição às condições de atmosfera do ar.

A etapa crítica do desenvolvimento embrionário, onde existem necessidades nutritivas e metabólicas que aumentam conforme o número de células é o cultivo, etapa escolhida para testar as modificações de tamponamento. Para que os resultados não sofressem influência das etapas anteriores, foi estabelecido para a fase da maturação, além do critério subjetivo, a coloração e a classificação dos estágios de maturação

encontrados. As taxas de maturação foram avaliadas em 4 das 13 repetições consideradas no trabalho.

A tabela 1 mostra que a maturação ovocitária não influenciou o experimento pois não houve diferença entre as categorias de ovócitos consideradas. Foi possível estimar o potencial de viabilidade que é transmitido pela aparência do *Cumulus oophorus* e comprová-lo através das taxas obtidas e apresentadas.

Pôde ser observado que a maioria (70%) dos ovócitos (n=120) submetidos à etapa da fecundação, independente do seu grupo de qualidade morfológica encontravam-se no estágio de metáfase II e portanto estavam maduros (tabela 1).

Com isso, após 24 horas de cultivo, independente do grau de classificação morfológica, a maioria dos ovócitos alcançaram o estágio de metáfase II.

Os critérios de classificação morfológica foram identificados em todos os ovócitos. Na etapa de maturação, para os ovócitos destinados à fertilização esses critérios não foram considerados, portanto os ovócitos foram distribuídos de maneira aleatória entre todos os tratamentos.

**Tabela 1.** Taxas de maturação nuclear obtidas a partir de 10% dos ovócitos que foram aspirados e selecionados quanto aos critérios morfológicos de qualidade.

| <b>Ovócitos</b>         | <b>Metáfase I</b> | <b>Metáfase II</b> |
|-------------------------|-------------------|--------------------|
| <b>Grupo (n)</b>        | <b>% (n)</b>      | <b>% (n)</b>       |
| <b>G1</b> (38)          | 12 (5)            | 79 (30)            |
| <b>G2</b> (42)          | 12 (5)            | 79 (34)            |
| <b>G3</b> (40)          | 16 (7)            | 74 (30)            |
| <b>Total</b> <b>120</b> | <b>17</b>         | <b>94</b>          |

Para a etapa de maturação em que os ovócitos foram destinados à coloração, 10% do material obtido no abatedouro foi selecionado de acordo com os critérios estabelecidos por Leibfried & First, 1979.

Nesta etapa, os critérios de classificação morfológica foram identificados e considerados, sendo que os ovócitos foram distribuídos separadamente por categoria nas gotas de maturação.

Mesmo os ovócitos com granulações citoplasmáticas e algumas manchas escuras, ou até fragmentos e vacuolizações que induzem ao descarte, apresentaram capacidade de serem fecundados.

Um critério comumente valorizado na seleção é a presença das células do *Cumulus oophorus*. O que pode ser salientado após a análise do material coletado é que mesmo os ovócitos pertencentes ao grau de qualidade 4 e que foram incluídos no grupo grupo 3 (ovócitos parcialmente desnudos e ovócitos sem células do *cumulus*) co-cultivados

por período de 24 horas apresentaram potencial para serem fecundados (tabela 1).

Os resultados apresentados na tabela 1, são semelhantes às taxas de maturação ovocitária *in vitro* em animais de laboratório e animais de produção (70 a 90 %) sendo superiores às verificadas em ovócitos felinos (50 a 65%). Esses índices devem-se à suplementação de FSH e LH no meio de cultura (Lópes et al., 2004).

De acordo com Beker et al (2002), a adição de 1µg/mL de estradiol na etapa de maturação, além de diminuir a taxa de ovócitos que atingem o estágio de MII, contribui para o aumento de aberrações nucleares afetando de maneira negativa a maturação nuclear dos ovócitos bovinos e o conseqüente desenvolvimento embrionário.

As taxas de maturação tornam-se importantes para eliminar a influência de fatores externos como a não competência ovocitária devido o material ser oriundo de abatedouro ou aos altos índices de degeneração dos ovócitos, já verificados no momento em que estes são retirados dos folículos de origem.

Os dados apresentados na tabela 1, concordam com Stojkovic., et al (1999) sugerindo que após a extrusão do primeiro corpúsculo polar existem outras modificações de especial interesse que podem influenciar a ativação do ovócito como por exemplo a persistência do corpúsculo polar ou a ocorrência de sua fragmentação ao invés da sua degradação total.

Outros dados publicados por Stojkovic *et al* (2001) destacaram que existem diferenças na reorganização mitocondrial e nos níveis de ATP

entre as categorias de ovócitos classificados como bons e pobres e que essas características podem ser correlacionadas aos critérios de classificação morfológica e também podem influenciar a capacidade de desenvolvimento dos ovócitos após a fertilização.

Para os ovócitos que foram fecundados, o critério subjetivo de classificação não foi considerado e além da distribuição aleatória dos grupos entre os tratamentos, procurou-se utilizar o mesmo sêmen para todos os tratamentos em cada rotina desenvolvida.

O meio HTF (IRVINE *Scientific*®) simples foi enriquecido com aminoácidos (essenciais 50X – B6766 e não-essenciais 100X – M7145) que constituem fatores de crescimento os quais potencializam o mecanismo de estimulação desencadeado pela presença do soro fetal no meio de cultivo, além de suas propriedades antioxidantes que reduzem a formação de superóxidos (BAVISTER, 1995; FEUGANG et al., 2004), pois a ausência de glutamina e aminoácidos essenciais inibe o desenvolvimento até blastocisto.

A glutamina associada aos aminoácidos essenciais são importantes precursores das glicoproteínas e dos glicolipídios contribuindo com a integridade celular (GARDNER et al., 1994).

Alguns autores descreveram a adição de vitaminas (BME – *basal medium of eagle*) e/ou insulina, transferrina e selênio (ITF), mas quando associados ao soro e/ou BSA não causaram aumento na taxa de blastocistos (CAMARGO et al., 2001; TRICOIRE et al., 1999; GILARDI et al., 2004) por isso não foram adicionados.

Análises do fluido do oviduto e do útero ao longo do ciclo hormonal revelaram mudanças na concentração de carboidratos tanto dentro do ciclo como entre o oviduto e o útero. Gardner e Lane (1997) verificaram que no oviduto, os níveis de glicose são mais baixos quando o ovócito/pré-embrião estão presentes (0,5 mM) e que o piruvato está aumentado (0,32 mM). Já no útero, a glicose alcançou um pico de 3,15 mM e o piruvato apresentou bem diminuído (0,1 mM) (ALMODIN et al., 2001).

Entretanto, deve-se levar em consideração que o ovócito e o pré-embrião são circundados por células do *cumulus*, muito ativas metabolicamente e consomem glicose liberando piruvato e lactato. Além disso, o embrião de duas células possui um transportador específico para a glicose, indicando alguma função fisiológica para esta hexose, talvez outra que não como fonte de energia (SCHOOLCRAFT et al., 1999). A glicose tem sido adicionada aos meios para cultivo embrionário 72 horas após a fertilização na maioria dos protocolos laboratoriais, independente da presença de co-cultivo celular (FORELL et al., 2001).

O tratamento 4, associou o tampão fosfato ao bicarbonato de sódio e as taxas de desenvolvimento embrionário foram inferiores aos tratamentos T1 e T2 ( $P < 0,05$ ) e semelhantes ao T3 ( $P > 0,05$ ). A taxa de desenvolvimento embrionário foi significativamente menor ( $P < 0,05$ ) para os estágios de mórula e blastocisto conforme descrito na tabela 2.

Esta queda nas taxas de desenvolvimento verificadas no T4 pode estar associada à presença de glicose. Foi adicionado 1,0 mM de glicose

em todos os tratamentos. Essa quantidade foi menor do que a quantidade sugerida por FORELL *et al*, (2001), que comprovou a necessidade da adição de glicose para o cultivo dos embriões após 72 horas. Devido ao efeito *Crabtree* observado em várias espécies, existe a possibilidade de que uma associação entre o tampão fosfato e a glicose tenha sido prejudicial à formação do blastocisto.

**Tabela 2.** Médias e desvios padrão das taxas de clivagem, mórulas e blastocistos para os ovócitos cultivados a 39°C, 5% de CO<sub>2</sub> 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>.

| Tratamento<br>(n) | Clivagem<br>(% ± S)      | Mórula<br>(% ± S)        | Blastocisto<br>(% ± S)  |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| T1 (400)          | 70,0 <sup>A</sup> ± 9,0  | 34,0 <sup>A</sup> ± 9,0  | 21,0 <sup>A</sup> ± 6,0 |
| T2 (400)          | 74,0 <sup>A</sup> ± 13,0 | 38,0 <sup>A</sup> ± 13,0 | 21,0 <sup>A</sup> ± 6,0 |
| T3 (400)          | 49,0 <sup>B</sup> ± 8,0  | 24,0 <sup>B</sup> ± 9,0  | 13,0 <sup>B</sup> ± 3,0 |
| T4 (400)          | 41,0 <sup>B</sup> ± 9,0  | 17,6 <sup>B</sup> ± 6,0  | 9,0 <sup>B</sup> ± 2,0  |

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas na mesma coluna diferem entre si (P<0,05).

O desvio da utilização da glicose para outras vias pode levar à biossíntese de importantes anabólitos para o embrião e o caminho metabólico dos nutrientes preferidos pode levar a vantagens no suporte do desenvolvimento do embrião *in vitro* (ALMODIN *et al.*, 2001).

Importantes reguladores do metabolismo energético são os aminoácidos. Os aminoácidos essenciais não parecem conferir nenhum

benefício ao embrião até o estágio de 8 células, e até podem resultar em perda de viabilidade (LANE et al., 2003).

A presença de alguns genes transcritos e que são expressos durante o bloqueio do desenvolvimento embrionário e na degeneração dos embriões produzidos *in vitro* foi descrita por Ripamonte et al., 2005. Os mesmos autores detectaram a existência de dois grupos de embriões: o embrião que atinge mais rapidamente o estágio de 8 células e portanto têm maior potencial de tornar-se um blastocisto e o embrião mais lento que ativa os genes associados aos processos de morte celular por apoptose.

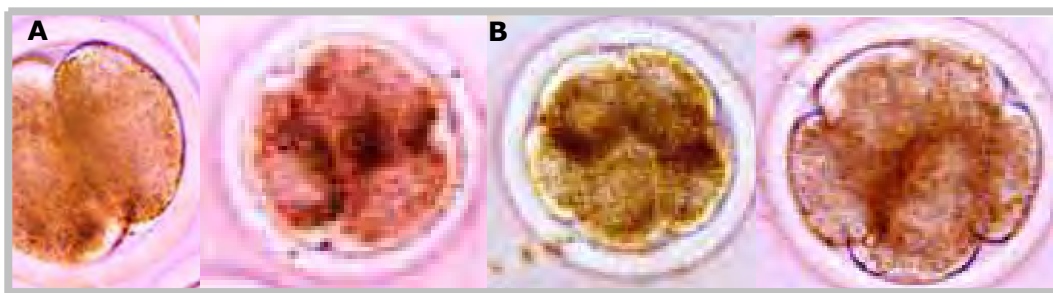
Neste trabalho, ao analisar o desenvolvimento embrionário foi verificado bloqueio no estágio de 8 a 16 células, independente das modificações efetuadas nos meios de cultivo, justificando a visível queda no desenvolvimento embrionário verificada a partir das taxas de clivagem para todos os tratamentos que foram, respectivamente, de 70,0%; 74,0%; 49,0% e 41,0% nos embriões cultivados em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>.

Quanto à formação das mórulas, houve diferença significativa nas taxas embrionárias obtidas nos tratamentos 1 e 2 (34,0% e 38,0%) quando comparados aos tratamentos 3 e 4 (24,0% e 17,6%) como pode ser observado na tabela 2.

Esses dados indicaram que as modificações efetuadas no meio de cultivo HTF (IRVINE *Scientific*®) contribuíram com o desenvolvimento embrionário a partir dos estágios iniciais após a clivagem, como

demonstrado na figura 3, até os estágios de mórula e blastocisto (34,0% mórulas e 21,0% de blastocistos) e não apresentou diferença significativa quando comparado ao T2 que apresentou taxas superiores aos demais tratamentos (38,0% de mórulas e 21,0% de blastocistos).

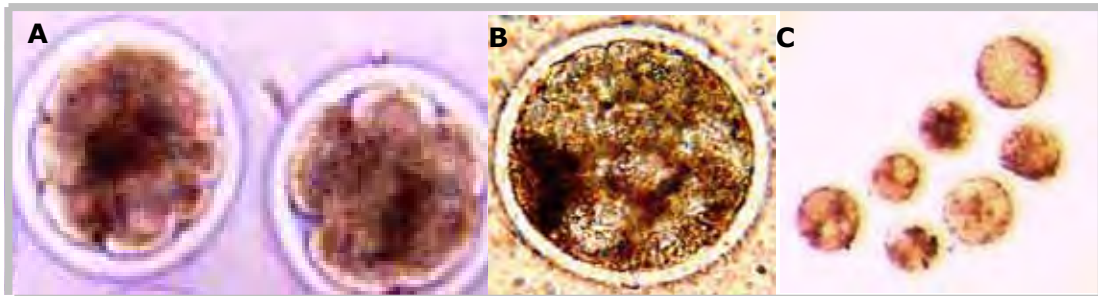
Em estudo realizado por Fleury, 2002 verificou-se que a presença de HEPES no meio HAM F-10 não apresentou efeito deletério sobre as taxas de gestação para embriões eqüinos que permaneceram nesse meio por até 18 horas antes da inovulação.



**Figura 3 – Estágios iniciais do desenvolvimento embrionário. A** - Aspecto dos embriões clivados 24 horas após a fertilização. **B** - Embriões de 8 a 16 células obtidos 72 horas após a fertilização (fotomicrografia em aumento de 400 x).

É importante destacar que um critério considerado durante a avaliação dos resultados foi o aspecto da conformação celular (figuras 4 e 5) na formação dos embriões. Não houve diferença morfológica na qualidade embrionária entre os tratamentos, avaliação que não permite ser efetuada em trabalhos que utilizam o HEPES em meios de

manutenção, pois nesses casos não há a presença do HEPES na formação do embrião.



**Figura 4 – Fotomicrografia de embriões PIV. A-** Mórulas produzidas a 39°C em atmosfera de cultivo com 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de umidade relativa em meio SOFaa com 25 mM de bicarbonato de sódio (aum. de 400 x). **B-** Blastocisto produzido a 39°C em atmosfera de cultivo com 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de umidade relativa em meio SOFaa com 9 mM de bicarbonato de sódio e 4 mM de HEPES (aum. de 400 x). **C-** Blastocistos produzidos a 39°C em atmosfera de cultivo com 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de umidade relativa resultantes de todos os tratamentos e dispostos na mesma gota em meio HTF Irvine Scientific® para fotografia (aumento de 100 x).

Apesar disso, os trabalhos que justificam a adição de HEPES no meio de cultivo embrionário referem-se à praticidade em dispensar uma atmosfera controlada com CO<sub>2</sub> para equilíbrio de pH (GORDON, 1994) o que teoricamente é justificável, mas a produção de embriões *in vitro* em

atmosfera sem a presença de CO<sub>2</sub> no sistema ainda não é possível com os tampões usualmente utilizados.

Outra justificativa para associação do tampão orgânico HEPES seria de que esse tampão protege a molécula de DNA dos efeitos do peróxido de hidrogênio (ERMILOV et al., 1999) mas é sabido que a produção de radicais livres no sistema de cultivo verifica-se tanto em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> em ar (FEUGANG et al., 2004) como em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub> o que possibilita associar a poluição do sistema com radicais livres aos eventos que acontecem em todos os organismos vivos e que estão mais associados à presença de CO<sub>2</sub> do que a presença de O<sub>2</sub>, por isso existem poucos trabalhos descrevendo os efeitos dos radicais livres no sistema reprodutivo da fêmea (OYAWOYE et al., 2003; PASQUALOTTO et al., 2004; AGARWAL et al., 2005).

Com base nos achados deste experimento, as taxas obtidas para os embriões dos tratamentos T3 e T4 que foram cultivados em atmosfera gasosa com 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub> foram superiores às obtidas quando os embriões foram mantidos nos mesmos meios do T1 e T2, em atmosfera gasosa com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e 100% de umidade relativa.

Diferentes critérios de seleção têm sido propostos desde os estágios iniciais de clivagem, como a morfologia pronuclear, primeiras clivagens e a morfologia do zigoto após 72 horas de clivagem (SCOTT et al., 2007). Mesmo as avaliações efetuadas 24 horas após a fertilização apresentam correlação adequada com o desenvolvimento, implantação e prenhez

embora esses critérios sejam pouco citados na PIV de embriões bovinos (SCOTT, 2002, 2003; EBNER et al., 2003; RIENZI et al., 2005; HOLTE et al., 2007).

O padrão de qualidade utilizado para o critério de qualidade embrionária nos diferentes tratamentos foi o estabelecido por Veeck, (1999) que classificou os embriões pelo aspecto e tamanho dos blastômeros além de avaliar a simetria das clivagens através dos graus de fragmentação (escore de 1 a 5).

Os embriões produzidos e cultivados a partir dos meios com tampão bicarbonato de sódio dos tratamentos T1 e T2 apresentaram, no critério qualidade embrionária, conformação celular similares em todos os tratamentos. Esse fato caracterizou a mesma aparência de qualidade aos embriões produzidos e cultivados a partir dos meios com tampão bicarbonato de sódio (figuras 4A e 5A) modificado pela associação com HEPES (tratamento 3) e aos embriões cultivados a partir da associação com o fosfato (tratamento 4).

Os valores demonstrados nas tabelas 2 e 3 referem-se à quantidade de embriões (taxas de clivagem, mórula e blastocisto) que desenvolveram-se nos meios de cultivo propostos nos tratamentos e atmosferas gasosas descritas. Ficou comprovado que os eventos fisiológicos e morfológicos associados à formação do zigoto e à diferenciação celular para a formação do blastocisto (WRENZYCKI et al., 2005) sofreram influência dos fatores relacionados ao sistema de cultivo *in vitro*.

As variações de pH ganharam maior atenção recentemente devido à observação dos procedimentos em tecnologias de Reprodução Assistida para embriões humanos. O pH do meio de cultivo é determinado pela combinação entre a composição do meio na atmosfera de cultivo e a concentração de CO<sub>2</sub> cuja função no sistema é o controle do pH (QUINN, 2003).

As observações referentes à atmosfera gasosa confirmaram a influência do dióxido de carbono na atual formulação dos meios de cultivo devido a grande interação do CO<sub>2</sub> com o bicarbonato de sódio para manutenção do pH. Os meios de cultivo contendo apenas o bicarbonato de sódio em sua formulação foram responsáveis pelas maiores taxas de blastocisto (figura 4).

Observando os resultados das tabelas 2 e 3 verifica-se que à temperatura de 39°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e 100% de umidade relativa (tabela 3), o desenvolvimento embrionário apresentou diferença significativa ( $P < 0,05$ ) para as taxas de clivagem (T1:38,0%; T2:34,5%; T3:30,4% e T4:21,5%), mórulas (T1:20,4%; T2:18,3%; T3:14,6% e T4:11,0%) e blastocistos (T1:12,4%; T2:11,0%; T3:8,6% e T4:6,0%) quando comparado ao cultivo em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub> a temperatura de 39° C considerando também as taxas de clivagem (T1:70,0%; T2: 74,0%; T3:49,0% e T4:41,0%), mórulas (T1:34,0%; T2:38,0%; T3:24,0% e T4:17,6%) e blastocistos (T1:21,0%; T2:21,0%; T3:13,0% e T4:9,0%) como está demonstrado na tabela 2, determinando que há necessidade de concentrações controladas

de oxigênio em combinação ao dióxido de carbono na mistura gasosa, mesmo quando foi adicionado aos constituintes dos meios de cultivo outros tampões. Existiu diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre as duas atmosferas gasosas em todas as etapas do desenvolvimento embrionário.

**Tabela 3.** Média e desvios padrão das taxas de clivagem, mórulas e blastocistos para os ovócitos cultivados a 39°C, 5% de CO<sub>2</sub> em ar e 100% de umidade relativa.

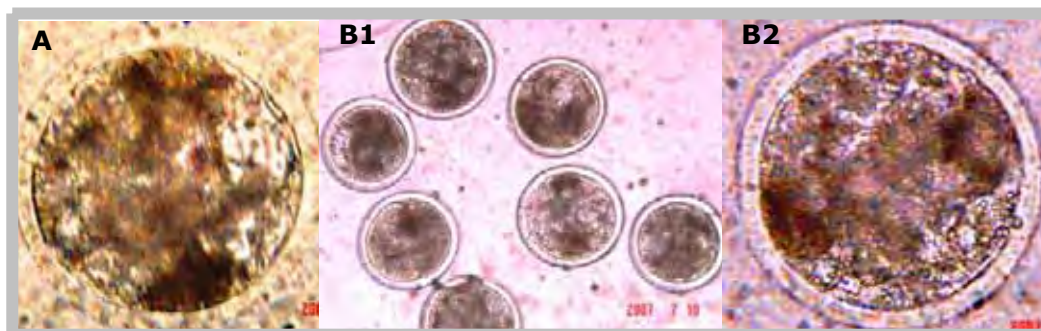
| <b>Tratamento</b> | <b>Clivagem</b>           | <b>Mórula</b>            | <b>Blastocisto</b>      |
|-------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|
| <b>(n)</b>        | <b>(% ± S)</b>            | <b>(% ± S)</b>           | <b>(% ± S)</b>          |
| T1 (400)          | 38,0 <sup>A</sup> ± 13,0  | 20,4 <sup>A</sup> ± 5,0  | 12,4 <sup>A</sup> ± 4,0 |
| T2 (400)          | 34,5 <sup>A</sup> ± 12,0  | 18,3 <sup>A</sup> ± 4,0  | 11,0 <sup>A</sup> ± 3,0 |
| T3 (400)          | 30,4 <sup>AB</sup> ± 14,0 | 14,6 <sup>AB</sup> ± 4,0 | 8,6 <sup>AB</sup> ± 3,0 |
| T4 (400)          | 21,5 <sup>B</sup> ± 7,0   | 11,0 <sup>B</sup> ± 4,0  | 6,0 <sup>B</sup> ± 2,0  |

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas na mesma coluna diferem entre si ( $P < 0,05$ ).

Em ambas as atmosferas gasosas, o desenvolvimento embrionário a partir do estágio de mórula foi significativamente inferior ( $P < 0,05$ ) nos tratamentos T3 (24,0% e 14,6%) e T4 (17,6% e 11,0%) e esta diminuição também foi verificada para as taxas de blastocisto (T3: 13,0% e 8,6%) e T4 (9,0% e 6,0%). Essas associações entre os tampões (bicarbonato de sódio e HEPES e bicarbonato de sódio e fosfato) foram feitas na tentativa de proporcionar maior estabilidade às soluções dentro e fora da estufa.

Os dados da tabela 3, indicam que a adição de baixas concentrações de HEPES ao sistema de cultivo não contribuiu para aumentar a taxa de produção de blastocistos em ambas as atmosferas testadas para todas as etapas do desenvolvimento embrionário.

Esse fato pode ser confirmado pelas taxas de clivagem, mórula e blastocisto observadas nos tratamentos nas duas atmosferas gasosas (T3: 49,0%; 24,0% e 13,0% em comparação a T3: 30,4%; 14,6% e 8,6%) e em comparação às taxas de clivagem, mórula e blastocisto obtidas no tratamento 1 e 2 (figura 5B) terem sido superiores.



**Figura 5 – Fotomicrografia de embriões PIV. A-** Blastocisto produzido a 39°C em atmosfera de cultivo com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e 100% de umidade relativa em meio SOFaa com tampão de 9 mM de bicarbonato de sódio e 12 mM de fosfato de sódio (aum. de 400 x). **B1-** Blastocistos produzido a 39°C em atmosfera de cultivo com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e 100% de umidade relativa em meio SOFaa com tampão de 25 mM de bicarbonato de sódio (aum. de 200 x) e **B2-** Aumento de 400 x.

Outros componentes do meio de cultivo ou ainda as condições em que este experimento foi desenvolvido são fatores que também podem ter contribuído para a diminuição das taxas apresentadas. A presença do HEPES ou do fosfato nas concentrações dos meios de cultivo descritos neste experimento foi determinante para a indicação ou não da utilização de outros tampões biológicos e outras concentrações em associação ao bicarbonato de sódio para estes fins.

Os resultados verificados para o tratamento 4, composto pelo meio SOFaa modificado pela adição de 12 mM de fosfato de sódio (figura 5A) e diminuição da concentração de bicarbonato de sódio foram inferiores aos outros tratamentos em ambas as atmosferas testadas (T4: 41,0%; 17,6% e 9,0%) em comparação a T4: 21,5%; 11,0% e 6,0%. Este tratamento diferiu apenas dos tratamentos T1 e T2 e das taxas de blastocistos do T3. Não houve diferença estatística para as taxas de clivagem e mórula entre os tratamentos 3 e 4 (tabela 3).

Os valores de pH obtidos para os meios com tampão de bicarbonato de sódio apresentaram variação que elevou o pH tornando-o básico em diversas etapas do experimento, principalmente nos momentos em que fez-se necessário a retirada das placas de dentro da estufa para a análise da clivagem e *Feeding*, quando os embriões ficaram expostos a atmosfera ambiente. Apesar destes procedimentos serem rápidos a variação demonstrada indica que mesmo no interior da atmosfera controlada o pH não se mantém no valor fisiológico de 7,3 a 7,5 ideal para o cultivo embrionário.

A associação do HEPES ao bicarbonato de sódio efetuada no tratamento 3 em ambas as atmosferas, apenas demonstrou maior eficácia em promover menor variação de pH. O HEPES também foi utilizado na etapa de maturação na concentração de 20mM e sua capacidade de estabilizar pH não é deletéria aos índices de clivagem.

As oscilações de pH que freqüentemente ocorrem durante as manipulações embrionárias em atmosfera e temperatura ambiente foram visivelmente minimizadas nas soluções que ficaram mais estáveis devido à associação do HEPES (figura 4B) e do fosfato (figura 5A) ao bicarbonato de sódio.

O HEPES é usualmente utilizado em concentrações de até 25mM aumentando também os índices de blastocisto sobre o total de ovócitos e sobre o total de clivados (MONTAGNER, et al., 2000), mas é importante ressaltar que além da atmosfera gasosa, sua concentração parece ser dependente da espécie, das manipulações e das condições de cultivo para PIV em cada laboratório ou mesmo em cada procedimento de maneira isolada.

Portanto os resultados obtidos neste experimento não foram suficientes para descartar a adição de HEPES ou a associação de tampões biológicos na formulação dos meios que forem utilizados fora de estufa com atmosfera controlada. Esta é uma alternativa que poderá contribuir para a estabilização dos constituintes dos meios em contato com os embriões (figura 4) e conseqüentemente para a melhoria do sistema de cultivo.

Por isso é fundamental reforçar que este assunto ainda exige maiores estudos que aprofundem os conceitos do metabolismo embrionário com os constituintes das formulações que dispensam o sistema complexo de co-cultivo celular.

Na análise estatística dos dados não foi dada importância ao efeito touro gerado pela utilização de reprodutores diferentes. Esta variável foi isolada na aplicação do teste estatístico para que a influência dos meios de cultivo nos tratamentos ficasse dependente apenas da interação entre a atmosfera gasosa e os sistemas de tamponamento.

**Tabela 4.** Porcentagem média de clivagem, mórula e blastocisto de acordo com o sêmen utilizado na fertilização dos ovócitos nas duas atmosferas gasosas.

| <b>Touro</b> | <b>Clivagem<br/>(%)</b> | <b>Mórula<br/>(%)</b> | <b>Blastocisto<br/>(%)</b> |
|--------------|-------------------------|-----------------------|----------------------------|
| T1Gangster   | 74,0 <sup>B</sup>       | 48,0 <sup>B</sup>     | 35,5 <sup>A</sup>          |
| T2 N-186     | 70,0 <sup>B</sup>       | 46,0 <sup>B</sup>     | 35,0 <sup>A</sup>          |
| T3 Nel.Red   | 84,0 <sup>A</sup>       | 54,0 <sup>A</sup>     | 36,0 <sup>A</sup>          |

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas na mesma coluna diferem entre si (P<0,05).

Apesar disso, para as taxas de clivagem, foi considerada a interação entre o número de ovócitos e os diferentes touros utilizados, mesmo que o número de repetições tenha sido diferente para cada animal. Todos os touros foram utilizados nas duas atmosferas gasosas, sendo que o touro 1

fertilizou 720 ovócitos em 4 repetições, o touro 2 fertilizou 1920 ovócitos em 7 repetições e o touro 3 fertilizou 560 ovócitos em 2 repetições.

Mesmo com um número de repetições desigual para cada touro, o número de ovócitos foi expressivo para demonstrar que houve diferença entre os reprodutores sobre as taxas de clivagem, mórula e blastocisto do experimento, conforme apresentado na tabela 4.

Outros estudos a respeito da estrutura química tamponante devem ser realizados, na tentativa de desenvolver sistemas práticos de cultivo. Tais estudos devem ter o intuito de contribuir com o melhoramento das condições de cultivo e oferecer também maior estabilidade às variações de pH verificadas nos procedimentos de PIV durante a manipulação dos ovócitos e embriões dentro e fora da estufa.

Esse trabalho sugere pesquisas direcionadas à bioquímica do desenvolvimento embrionário para que num futuro próximo exista a possibilidade de substituírmos as incubadoras atuais e dar início a uma produção de embriões que tenha desenvolvimento auto-suficiente a partir das próprias soluções de cultivo. Somente as modificações nos meios de cultivo que combinarem suas formulações com as variações da atmosfera gasosa poderão obter êxito em suas avaliações.

Com base nas idéias que foram apresentadas, possivelmente, os experimentos realizados irão colaborar de forma positiva para o desenvolvimento de outras pesquisas referentes aos assuntos: Sistemas de cultivo embrionário e Bloqueio do desenvolvimento embrionário.

É de grande interesse que algumas lacunas ainda existentes e que englobam os meios de cultivo utilizados em todas as etapas da produção *in vitro* de embriões bovinos sejam reavaliadas. O estudo de modificações no tamponamento dos meios e/ou a pesquisa de outros tampões biológicos mais estáveis pode também contribuir com a etapa de transporte e maturação dos ovócitos aspirados *in vivo* com auxílio de OPU.

Além disso, em um futuro próximo, esses sistemas contribuirão progressivamente com a garantia da viabilidade dos embriões PIV associadas às técnicas de criopreservação.

## **5 CONCLUSÕES**

### **5.1 Comportamento das soluções tamponantes no desenvolvimento embrionário simultâneo em 4 meios de cultivo.**

Verificou-se que a variação e/ou associação de diferentes agentes tamponantes contribuiu para a estabilização de pH e osmolaridade dos meios.

As associações entre os sistemas tamponantes permitiu o desenvolvimento embrionário, mas não melhorou de maneira significativa os índices de clivagem e mórula quando o cultivo foi efetuado em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e 100% de umidade relativa.

A adição de HEPES quando o cultivo foi efetuado em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub> pode ter contribuído para a produção *in vitro* de blastocistos bovinos.

### **Perspectiva**

A exemplo do que foi testado com esses experimentos, outros trabalhos com propostas de variações e/ou associações entre outros sistemas tampões, testando novas concentrações poderão atingir melhores taxas de clivagem, mórulas e blastocistos para a produção de embriões bovinos *in vitro*.

## **5.2 Efeito de atmosferas gasosas diferentes sobre as taxas de clivagem, mórula e blastocisto dos embriões bovinos cultivados in vitro.**

Os meios contendo bicarbonato de sódio submetidos à atmosfera gasosa com 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub> proporcionaram maiores taxas de clivagem, mórula e blastocisto.

O cultivo embrionário em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub> contribuiu com as associações entre os tampões HEPES e fosfato para as taxas de mórula e blastocisto.

### **Perspectiva**

Ainda não é possível atingir um equilíbrio tamponante que forneça suporte suficiente para estabilizar os meios de cultivo embrionário contendo bicarbonato de sódio na ausência de uma atmosfera controlada. Mesmo com a associação de outros tampões ao bicarbonato de sódio na composição dos meios de cultivo, as taxas de desenvolvimento embrionário foram superiores quando o cultivo foi efetuado em atmosfera gasosa com 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>.

## 6. REFERÊNCIAS

ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryo and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 57-66, 2002.

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. Oxidative stress and its implications in female infertility – a clinician's perspective. **Reprod. Biomed. Online**, v. 11, p. 641–650, 2005.

AGCA, Y.; LIU, J.; RUTLEDGE, J. J.; CRISTER, E. S.; CRISTER, J. K. Effect of osmotic stress on the developmental competence of germinal vesicle and metaphase II stage bovine *cumulus* oocyte complexes and its relevance to cryopreservation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 212-219, 2000.

ALI, A.; SIRARD, M. A. Protein kinases influence bovine oocyte competence during short-term treatment with recombinant human follicle stimulating hormone. **Reproduction**, v. 130, p. 303-310, 2005.

ALMODIN, C. G.; MINGUETTI-CÂMARA, V. C.; PEREIRA, L. A . C.  
Cultura de embriões até o estágio de blastocisto: Comparação  
entre o uso de meios seqüenciais e de co-cultura. **RBGO**, v. 23,  
n. 9, p. 589-595, 2001.

BAGGER, P.V.; BYSKOV, A.G.; CHRISTIANSEN, M. D. Maturation  
of mouse oocytes *in vitro* is influenced by alkalization during  
their isolation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 80,  
p. 251-255, 1987.

BARNES, F. L. & FIRST, N. L.

Embryonic transcription *in vitro* cultured bovine embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 29, n. 2, p.117-23,1991.

BAVISTER, B. D. Co-culture for embryos development: is it really necessary? **Hum. Reproduction**, v. 7 (10), p. 1339-1341, 1992.

BAVISTER, B. D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Hum. Reprod. Update**, v. 1, p. 91-148, 1995.

BAVISTER, B. D. Media pH. Embryo Mail News 2000; December 4. Available at: <http://www.lpsi.barc.usda.gov/scripts/odbic.exe/embryomail>. Last accessed: July 12, 2007.

BEKER, A. R. C. L.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. Effect of  $17\beta$  - estradiol on the *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 58, p. 1663-1673, 2002.

BERNARDI, M. L.; FLÉCHON, J. E.; DELOUIS, C. Influence of culture system and oxygen tension on the development of ovine zygotes matured and fertilized *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.106, p.161-167, 1996.

BRACKETT, B. G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M. L.; DONAWICK, W. J.; EVANS, J. F. DRESSEL, M. A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v.27, p. 147-158, 1982.

CALDER, M. D.; CAVENEY, A. N.; SMITH, L. C.; WATSON, A. J. Responsiveness of bovine *cumulus-oocyte-complexes* (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs

during maturation *in vitro*. **Reprod. Biol. Endocrinol.** V.1, n. 14, 2003.

CAMARGO, L. S. A.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M. Cultivo *in vitro* de embriões bovinos em meio suplementado com citrato, taurina, insulina e/ou vitaminas. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA**, 2001, Salvador. Anais...Salvador: Conselho Federal de Medicina Veterinária, p. 251 – 252, 2001.

CARNEY, E. W. & BAVISTER, B. D. Regulation of hamster embryo development *in vitro* by carbon dioxide. **Biol. Reprod.**, v. 36, p. 1155–1163, 1987.

CHANG, M.C. Fertilization of rabbit ova *in vitro*. **Nature**, v. 184, p. 466-467, 1959.

CHATOT, C. L.; ZIOMEK, C. A.; BAVISTER, B. D.; LEWIS, J. L.; TORRES, I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.**, v. 86, p. 679-688, 1989.

DE SOUSA, P. A.; CAVENEY, A.; WESTHUSIN, M. E.; WATSON, A. J. Temporal patterns of embryonic gene expression and their

dependence on oogenetic factors. **Theriogenology**, n. 49, v. 1, p. 115-128, 1998.

DEVREKER, F.; HARDY, K.; VAN DEN BERGH, M.; VANNIN, A. S.; EMILIANI, S.; ENGLERT, Y. Amino acids promote human blastocyst development *in vitro*. **Hum. Reprod.**, v.16, p. 749-756, 2001.

DONNAY, I.; FEUGANG, J. M.; BERNARD, S. Impact of adding 5.5 mM glucose to SOF medium on the development, metabolism and quality of *in vitro* produced bovine embryos from the morula to the blastocyst stage. **Zygote**, v. 10, n. 3, p. 189-199, 2002.

DOWNS, S. M. & MASTROPOLO, A. M. Culture conditions affect meiotic regulation in *cumulus* cell-enclosed mouse oocyte. **Molecular Reproduction and Development**, v.46, p.551-566, 1997.

EBNER, T.; MOSER, M.; SOMMERGRUBER, M.; TEWS, G. Selection based on morphological assessment. **Hum. Reprod. Update**, p. 251-262, 2003.

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**, v. 10, p. 327-332, 1998.

EINSPANIER, R.; SHÖNFELDER, M.; MÜLLER, K.; STOJKOVIC, M.; KOSMANN, M.; WOLF, E.; SCHAMS, D. Expression of the vascular endothelial growth factor and its receptors and effects of VEGF during *in vitro* maturation of bovine *cumuli-oocyte complexes* (COCs). **Mol. Reprod. Dev.**, v. 62, n. 1, p. 29-36, 2002.

ELVIN, J. A.; CLARK, A. T.; WANG, P.; WOLFMAN, N. M.; MATZUK, M. M. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. **Mol. Endocrinol.**, v. 13, p. 1035-1048, 1999.

ERBACH, G. T.; LAWITTS, J. A.; PAPAIOANNOU, V. E.; BIGGERS, I. D. Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. **Biol. Reprod.**, v.51, n.2, p. 345, 1994.

ERMILOV, A.; DIAMOND, M. P.; SACCO, A. G.; DOZORTSEV, D. D. Culture media and their components differ in their ability to scavenge reactive oxygen species in the plasmid relaxation

assay. **Fertil. Steril.**, v. 72, n. 1, p. 154-157, 1999.

EYESTONE, W. H. & FIRST, N. L. Characterization of developmental arrest in early bovine embryos cultured *in vitro*. **Theriogenology**, v. 35, p. 613-625, 1991.

FAN, H. Y.; HUO, L. J.; CHEN, D. Y.; SCHATTEN, H.; SUN, Q. Y. Protein kinase C and mitogen-activated protein kinase cascade in mouse *cumulus* cells: cross talk and effect on meiotic resumption of oocyte. **Biol. Reprod.**, v. 70, p. 1178-1187, 2004.

FAN, H. Y. & SUN, Q. Y. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 535-547, 2004.

FEUGANG, J. M.; DE ROOVERA, R.; MOENSA, A.; LEONARDA, S.; DESSY, F.; DONNAYA, I. Addition of b-mercaptoethanol or Trolox1 at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. **Theriogenology**, v. 61, p. 71-90, 2004.

FLEURY, J. J.; FLEURY, P. D. C.; LANDIM-ALVARENGA F.C. Effect of embryo diameter and storage period on pregnancy rates obtained with equine embryos stored in Ham's F-10 with Hepes Buffer at a temperature of 15-18°C. **Theriogenology**, Gainesville, FL, v. 58, p. 749-750, 2002.

FONG, C.Y. & BONGSO, A. Comparison of human blastulation rates and total cell number in sequential media with and without co-culture. **Hum. Reprod.**, v.14, p. 774-781, 1999.

FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; LOPES, R. F. F.; PASSO, E. P.; RODRIGUES, J. L. Desenvolvimento de embriões bovinos cultivados em meio semi-definido suplementado com 1,5mM de glicose. **J. Bras. Reprod. Assist.**, Ribeirão Preto, v. 5, n. 1, p. 14-18, 2001.

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

GARDNER, D. K. & LANE, M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? **Hum. Reprod. Update**, v.3, p. 367-382, 1997.

GARDNER, D. K.; VELLA, P.; LANE, M.; WAGLEY, L.; SCHLENKER, T.; SCHOOLCRAFT, W. B. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. **Fertil. Steril.** v. 69, p.84-88, 1998.

GARDNER, D.K. & LANE, M. Embryo culture. In Gardner, D.K., WEISSMANN, A., HOWLES, C. M. AND SHOHAM, Z. (eds), *Textbook of Assisted Reproductive Technologies. **Laboratory and Clinical Perspectives***. Martin Dunitz, London, p. 203–222, 2001.

GESHI, M.; YONAI, M.; SAKAGUCHI, M.; NAGAI, T. Improvement of *in vitro* co-culture systems for bovine embryos using a low concentration of carbon dioxide and medium supplemented with  $\beta$  - mercaptoethanol. **Theriogenology**, v. 51, p. 551-558, 1999.

GILARDI, S.G.T.; SÁ, F. W.; CAMARGO, L. S. A; FERREIRA, A. M.; MACHADO, M. A.; SERAPIÃO, R. V.; SOARES, A. B. M.; PINHO, T. G.; VIANA, J. H. M. Effect of different culture media on

development and sex ratio of bovine embryos fertilized *in vitro*.  
**Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 56, n. 5, p. 623-627, 2004.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F.  
**Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 1ª edição. Ed.  
Varela, SP, v. 1, 340 p. 2002.

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

GOOD, N. E.; WINGET, G. D.; WINTER, W., *et al.* Hydrogen ion  
buffers for biological research. **Biochemistry**, v. 5, n. 2, p. 467-  
477, 1966.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. 1ª  
edição. Ed. Cambridge: University Press, p. 639, 1994.

GOTO, K.; IWAI, N.; TAKUMA, Y., *et al.* Co-culture of *in vitro*  
fertilized bovine embryos with different cell monolayers. **Journal  
of Animal Science**, v. 70, n. 5, p. 1449-1453, 1992.

GUERIF, F.; LE GOUGE, A.; GIRAudeau, B.; POINDRON, J.; BIDAULT, R.; GASNIER, O.; ROYERE, D. Limited value of morphological assessment at days 1 and 2 to predict blastocyst development potential: A prospective study based on 4042 embryos. **Human Reproduction**, v.22, n.7, p. 1973–1981, 2007.

GUERPEL, X.; BRUN, V.; GOUGEON, A. Oocyte bone morphogenetic protein 15, but not growth differentiation factor 9, is increased during gonadotropin-induced follicular development in the immature mouse and is associated with *cumulus oophorus* expansion. **Biol. Reprod.**, v. 75, p. 836–843, 2006.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

HOLTE, J.; BERGLUND, L.; MILTON, K.; GARELLO, C.; GENNARELLI, G.; REVELLI, A.; BERGH, T. Construction of an evidence-based integrated morphology cleavage embryo score for implantation potential of embryos scored and transferred on day 2 after oocyte retrieval. **Human Reproduction**, v. 22, n. 2, p. 548–557, 2007.

HUSSEIN, T. S.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. **Dev. Biol.**, v. 296, p. 514–521, 2006.

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

KATO, H. & SEIDEL, G. E. Maturation of bovine oocytes in hepes-buffered medium improves subsequent embryonic development. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 1, p. 174, 1995.

KESKINTEPE, L.; BURNLEY, C. A.; BRACKETT, B. G. Production of viable bovine blastocysts in defined *in vitro* conditions. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. 6, p. 1410-1417, 1995.

KESKINTEPE, L. & BRACKETT, B. G. *In vitro* developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 2, p. 333-339, 1996.

KHOSLA, S.; DEAN, W.; REIK, W.; FEIL, R. Culture of preimplantation embryos and its long-term effects on gene expression on phenotype. **Human Reprod. Update**, v. 7, p. 419-427, 2001.

KIMURA, N.; HOSHINO, Y.; TOTSUKAWA, K.; SATO, E. Cellular and molecular events during oocyte maturation in mammals: molecules of *cumulus*-oocyte complex matrix and signalling pathways regulating meiotic progression. **Soc. Reprod. Fertil. Suppl.** v. 63, p. 327-342, 2007.

LANE, M.; GARDNER, K. D.; HASLER, J. M.; HASLER, F. J. Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. **Theriogenology**, v. 60, p. 407-419, 2003.

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

LENINGHER, A. L.; NELSON, D. L.; MICHAEL, C. M. **Principles of biochemistry**. Worth Publishers, 1013 p. Louvert Ectryer. Bioquímica. Ed. Guanabara Cov., 1995.

LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; FAIR, T.; BOLAWD, M.P. Effect of culture environment on embryo quality and gene expression – experience from animal studies, **Reprod. Biom.**, v. 7, n. 6, p. 657-663, 2003a.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M. P. Oocyte and embryo quality: Effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reprod. Dom. Anim.** v. 38, p. 259–267, 2003b.

LÓPES, M. D.; UIECHI, E.; TRINCA, L. A . Avaliação da maturação nuclear *in vitro* de oócitos de gatas domésticas (*Felis catus*) pré-púberes e púberes. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v. 41 n. 4, 2004.

MACKLON, N. S.; PIETERS, M. H. E. C.; HASSAN, M. A.; JEUCKEN, P. H. M.; EIJKEMANS, M. J. C.; FAUSER, B. C. J. M. A prospective randomized comparison of sequential versus monoculture systems for *in vitro* human blastocyst development. **Human Reproduction**, v. 17, n. 10, p. 2700–2705, 2002.

MEIRELLES, F. V.; BORDIGNON, V.; WATANABE, Y.; WATANABE, M.; DAYAN, A.; LÔBO, R. B.; GARCIA, J. M.; SMITH, L. C. Complete replacement of the mitochondrial genotype in a *Bos*

*indicus* calf reconstructed by nuclear transfer to a *Bos taurus* oocyte. **Genetics**, v. 158, p. 351–356, 2001.

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. **An. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 82-83, p. 13-20, 2004.

MÉNÉZO, Y.; CHOUTEAU, J.; GUYADER-JOLY, C.; VEIGA, A. Sequential media: why and how? **Contracept Fertil. Sex.**, v. 27, p. 449-451, 1999.

MÉNÉZO, Y.; STRINGFELLOW, D.; BIELANSKI, A. Thoughts on risk management for *in vitro* production of bovine embryos. **Human Reproduction**, v. 13, n. 4, p. 256-265, 1998.

MÉNÉZO, Y. Oocyte capacity to repair DNA damage induced in sperm. **J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.** Review (Paris – French), v.35, p.19-23, 2006.

MONTAGNER, M. M.; GONCALVES, P. B. D.; NEVES, J. P. N.; COSTA, L. F. S.; BORTOLOTO, E. B.; FARIAS, A. L.; STRANIERI,

P. Hepes na produção de embriões *in vitro* em bovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 469-474, 2000.

MORTIMER, D. & QUINN, P. Bicarbonate-buffered media and CO<sub>2</sub>. **Alpha Newslett**, 1996.

OGATA, S.; NAITO, T.; YORIOKA, N.; KIRIBAYASHI, K.; KURATSUNE, M.; KOHNO, N. Effect of lactate and bicarbonate on human peritoneal mesothelial cells, fibroblasts and vascular endothelial cells and the role of basic fibroblast growth factor. **Nephrol Dial Transplant**, v. 19, p. 2831-2837, 2004.

OYAWOYE, O.; ABDEL GADIR, A.; GARNER, A.; CONSTANTINOVICI, N.; PERRETT, C.; HARDIMAN, P. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. **Hum. Reprod.**, v. 18, p. 2270-2274, 2003.

OZAWA, M.; NAGAI, T.; KANEKO, H.; NAGUCHI, J.; OHNUMA, K.; KIKUCHI, K. Successful pig embryonic development *in vitro* outside a CO<sub>2</sub> gas-regulated incubator: Effects of pH and osmolality. **Theriogenology**, v. 65, p. 860-869, 2006.

PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M. A; FIRST, N. L. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biol. Reprod.** v. 38, n. 5, p. 1171-1180, 1988.

PASQUALOTTO, E. B.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. K.; IZZO, V. M.; PINOTTI, J. A.; JOSHI, N. J.; ROSE, B. I. Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. **Fertil. Steril.** v. 81, p. 973–976, 2004.

PERTOFT, H. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 44, p. 1-30, 2000.

POLLARD, J. W.; PLANTE, C.; LEIBO, S. P. Comparison of development of pig zygotes and embryos in simple and complex culture media. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, p. 331-337, 1995.

POOL, T. B. Recent advances in the production of viable human embryos *in vitro*. **Reprod. Biomed. Online**, v. 4, p. 294-302, 2002.

QUINN, P. Media used in the assisted reproductive technologies laboratories. In: Patrizio P.; Tucker, M. J.; Guelman, V., eds. A color atlas for human assisted reproduction. **Laboratory and**

**Clinical Insights.** Philadelphia, P. A: Lippincott Williams e Wilkins, p. 241-256, 2003.

QUINN, P. & COKE, SIMON. Equivalency of culture media for human *in vitro* fertilization formulated to have the same pH under an atmosphere containing 5% or 6% carbon dioxide. **Fert. Steril.**, v.81, p. 1502-1506, 2004.

QUINN, P. The development and impact of culture media for assisted reproductive technologies. **Fert. Steril.**,v.81, n. 1, p. 27-29, 2004.

RIEGER, D.; LOSKUTOFF, N. M.; BETTERIDGE, K. J. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.**, v. 95, n. 2, p. 585-595, 1992.

RIEGER, D.; MCGOWAN, L. T.; COX, S. T.; Effect of 2,4-dinitrophenol on the energy metabolism of the cattle embryos produced by *in vitro* fertilizations and culture. **Reproduction Fertility and Development**, v. 14, n. 5-6, p. 339-343, 2002.

RIENZI, L.; UBALDI, F.; IACOBELLI, M.; ROMANO, S.; MINASI, M.; FERRERO, S.; SAPIENZA, F.;BARONI, E.; GRECO, E.

Significance of morphological attributes of the early embryo.

**Reprod. Biomed. Online**, v. 10, p. 669–681, 2005.

RIPAMONTE, P.; MERIGHE, G.K.; WATANABE, Y.F.; CAETANO, A. R.; MEIRELLES, F. V. Development and optimization of a fluorescent differential display PCR system for studying bovine embryo development *in vitro*. **Genet. Mol. Res.** vol. 4, n. 4, p. 726-733, 2005.

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; REREZ-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. **Biol. Reprod.**, v, 68, p. 236-243, 2003.

ROLLIE, J. M. & BRUCE, M. M. **Química: um curso universitário**. 1ª edição, ed. Edgard Blucher, 2002.

ROSE-HELLEKANT, T. A; BAVISTER, B. D. Roles of protein kinase A and C in spontaneous maturation and in forskolin or 3-isobutyl-1- methylxanthine maintained meiotic arrest of bovine oocytes. **Mol. Reprod. Dev.** v. 44, p. 241–249, 1996.

ROSENKRANS Jr, C. F. & FIRST, N.L. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes *in vitro*. **J. Anim. Sci.**, v. 72, p. 434-437, 1994.

RUSSEL, J. B. **Química Geral**. 2ª edição, ed. Makron Books, 1994.

SCHINI, S. A.; BAVISTER, B. D. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. **Biol. Reprod.**, v. 39, p. 1183-1192, 1988.

SCHOOLCRAFT, W.D.; GARDNER, D. K.; LANE, M.; SCHLENKER, T.; HAMILTON, F.; MELDRUM, D. R. Blastocyst culture and transfer: analysis of results and parameters affecting outcome in two *in vitro* fertilization programs. **Fertil. Steril.**, v. 72, p. 604-609, 1999.

SCHULTZ, G.A.; HEYNER, S. Growth factors in preimplantation mammalian embryos. Review, **Oxf. Rev. Reprod. Biol.**, V.15, p. 43-81, 1993.

SCOTT, L. Morphological correlates of oocyte and embryo competence identification. In Van Blerkom J (eds). **Human Fertility**, v.5, p. 206-214, 2002.

SCOTT, L. The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. **Hum. Reprod. Update**, v. 9, p. 237–249, 2003.

SCOTT, L.; FINN, A .; O'LEARY,T.; MCLELLAN, S.; HILL, J. Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery:prospective and applied data for increased pregnancy rates. **Human Reproduction**, v. 22, n. 1, p. 230–240, 2007.

SIRARD, M-A.; DESROSIER, S.; ASSIDI, M. *In vivo* and *in vitro* effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. **Theriogenology**, v. 68, p. 71-76, 2007.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. Theory of Neutralization Titrations. In: **Fundamentals of Analytical Chemistry**, United States of America, Saunders, cap.10, p. 189-219, 2003.

STEFANELLO, J. R.; BARRETA, M. H.; PORCIUNCULA, P. M.; ARRUDA, J. N.; OLIVEIRA, J. F.; OLIVEIRA, M. A.; GONÇALVES, P.B. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and

embryo development. **Theriogenology**, v. 66, n. 9, p. 2068-2076, 2006.

STEPTOE, P. C. & EDWARDS, R. G. Birth after the preimplantation of a human embryo. **Lancet**, v. 2, p. 366, 1978.

STOJKOVIC, M.; MOTLIK, J.; KÖLLE, S.; ZAKHARTCHENKO, V.; ALBERIO, R.; SINOWATZ, F.; WOLF, E. Cell-cycle control and oocyte maturation: Review of literature. **Reprod. Dom. Anim**, v. 34, p. 335-342, 1999.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, A.S.; STOJKOVIC,P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER,P.; GONÇALVES, P.B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and Adenosine Triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 904–909, 2001.

STOJKOVIC, M.; KREBS, O.; KÖLLE, S.; PRELLE, K.; ASSMANN, V.; ZAKHARTCHENKO, V.; SINOWATZ, F.; WOLF, E. Developmental regulation of hyaluronan-binding protein (RHAMM/IHABP) expression in early bovine embryos. **Biol Reprod.** v. 68, n. 1, p. 60-66, 2003.

TELFORD, N. A.; WATSON, A. J.; SCHULTZ, G. A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 26, n. 1, p. 90-100, 1990.

TEOTIA, A.; SHARMA, G. T.; MAJUMDAR, A. C. Fertilization and development of caprine oocytes matured over granulosa cell monolayers. **Small Ruminant Research**, v. 40, n. 2, p. 165-177, 2001.

TERVIT, H. R.; WHITTINGHAM, D. G.; ROWSON, L. E. A successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 30, p. 493-497, 1972.

THOMPSON, J. G.; MCNAUGHTON, C.; GASPARRINI, B.; MCGOWAN, L.T.; TERVIT, H. R. Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and

blastulation of bovine embryos cultured *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.** , v. 118, p. 47–55, 2000.

TOSTI, E. Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, n. 26, p. 1-9, 2006.

TRICOIRE, H.; TOUZÉ, J.L.; MERMILLOD, P. Effect of fetal calf serum on the quality of *in vitro* produced cattle embryos. **Theriogenology**, v. 51, p. 257, 1999.

VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T., *et al.* Effect of pH of culture medium on *in vitro* development of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 47, p. 286, 1997.

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

VEECK, L. **Atlas of Human Gametes and Conceptuses**: an illustrated reference for assisted reproductive technology. Parthenon Publishing, New York, USA, 1999.

WATSON, A. J.; WATSON, P. H.; WARNES, D.; WALKER, S. K.; ARMSTRONG, D. T.; SEAMARK, R. F. Preimplantation development of *in vitro*-matured and *in vitro*-fertilized ovine zygotes: comparison between co-culture on oviduct epithelial cell monolayers and culture under low oxygen atmosphere. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 715-724, 1994.

WIEMER, K.E.; COHEN, J.; AMBORSKI, G.F. *In vitro* development and implantation of human embryos following culture on fetal bovine uterine fibroblast cells. **Hum. Reprod.** v. 4, p. 595-600, 1989.

WIEMER, K. E.; HOFFMAN, D. I.; MAXSON, W. S. Embryonic morphology and rate of implantation of human embryos following co-culture on bovine oviductal epithelial cells. **Hum. Reprod.** v. 8, p. 97-101, 1993.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; LUCAS – HAHN, A; KORSWE, K.; LEMME, E.; NIEMANN, H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from *in vitro* procedures and their implications for development. **Reprod. Fert. Dev.** 17, p. 23-25, 2005.

WRIGHT, R. W.; BONDIOLI, K. R. Aspects of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals. **Journal of Animal Science**, v. 53, 702–728, 1981.

YADAV, B. R. Relationship between the completion of first cleavage and the chromosomal complement, Sex and developmental rates of bovine embryos generated *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 36, p. 434-439, 1993.

## **7. APÊNDICE**

**Composição e características do estoque de meio PIV preparado no laboratório.**

### **7.1 SPERM-TALP**

| Componente / SPERM  | Concentração (mM) |
|---------------------|-------------------|
| Cloreto de Sódio    | 97.8              |
| Cloreto de Potássio | 3.10              |

|                                                                                      |                 |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Sulfato de Magnésio                                                                  | 0.40            |
| Cloreto de Cálcio                                                                    | 2.00            |
| Bicarbonato de Sódio                                                                 | 25.0            |
| HEPES                                                                                | 10.0            |
| Fosfato de Sódio                                                                     | 2.90            |
| Lactato de Sódio                                                                     | 16.9            |
| Sulfato de Gentamicina                                                               | 50 mg/mL        |
| Phenol Red                                                                           | 10 µg/mL        |
| Suplementação Protéica                                                               | ausente         |
| Coloração                                                                            | Vermelho        |
| Veículo                                                                              | Água ultra-pura |
| Volume                                                                               | 100 mL*         |
| <b>Composição e características do estoque de meio PIV preparado no laboratório.</b> |                 |
| <b>7.2 FERT-TALP</b>                                                                 |                 |
| Componente / FERT<br>(mM)                                                            | Concentração    |
| Cloreto de Sódio                                                                     | 114.0           |
| Cloreto de Potássio                                                                  | 3.20            |

|                                                                                          |                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Sulfato de Magnésio                                                                      | 0.80            |
| Cloreto de Cálcio                                                                        | 2.00            |
| Bicarbonato de Sódio                                                                     | 25.0            |
| Fosfato de Sódio                                                                         | 2.90            |
| Lactato de Sódio                                                                         | 7.60            |
| Phenol Red                                                                               | 10 µg/mL        |
| Suplementação Protéica                                                                   | ausente         |
| Coloração                                                                                | Vermelho        |
| Veículo                                                                                  | Água ultra-pura |
| Volume                                                                                   | 100 mL*         |
| <br><b>Composição e características do estoque de meio PIV preparado no laboratório.</b> |                 |
| <br><b>7.3 SOFaa</b>                                                                     |                 |
| Componente / SOF<br>(mM)                                                                 | Concentração    |
| Cloreto de Sódio                                                                         | 107.8           |
| Cloreto de Potássio                                                                      | 7.20            |
| Sulfato de Magnésio                                                                      | 0.48            |

|                        |                 |
|------------------------|-----------------|
| Cloreto de Cálcio      | 1.70            |
| Bicarbonato de Sódio   | 25.0            |
| Fosfato de Potássio    | 1.20            |
| Lactato de Sódio       | 1.50            |
| Glicose                | 1.00            |
| Glutamina              | 15 mg/mL        |
| AA 50X (B6766)         | 0.02 µL/mL      |
| AA 100X (M7145)        | 0.01 µL/mL      |
| Phenol Red             | 10 µg/mL        |
| Suplementação Protéica | ausente         |
| Coloração              | Vermelho        |
| Veículo                | Água ultra-pura |
| Volume                 | 100 mL*         |

**Composição e características dos estoque de meio PIV preparado no laboratório.**

**7.4 SOFaa HEPES**

|                        |                   |
|------------------------|-------------------|
| Componente / SOF-HEPES | Concentração (mM) |
| Cloreto de Sódio       | 107.8             |
| Cloreto de Potássio    | 7.20              |
| Sulfato de Magnésio    | 0.48              |
| Cloreto de Cálcio      | 1.70              |

|                                                                                      |                 |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Bicarbonato de Sódio                                                                 | 9.00            |
| HEPES                                                                                | 4.00            |
| Fosfato de Potássio                                                                  | 1.20            |
| Lactato de Sódio                                                                     | 1.50            |
| Glicose                                                                              | 1.00            |
| Glutamina                                                                            | 15 mg/mL        |
| AA 50X (B6766)                                                                       | 0.02 µL/mL      |
| AA 100X (M7145)                                                                      | 0.01 µL/mL      |
| Phenol Red                                                                           | 10 µg/mL        |
| Suplementação Protéica                                                               | ausente         |
| Coloração                                                                            | Laranja         |
| Veículo                                                                              | Água ultra-pura |
| Volume                                                                               | 100 mL*         |
| <b>Composição e características do estoque de meio PIV preparado no laboratório.</b> |                 |
| <b>7.5 SOFaa FOSFATO</b>                                                             |                 |
| Componente / SOF-Fosfato<br>(mM)                                                     | Concentração    |
| Cloreto de Sódio                                                                     | 107.8           |
| Cloreto de Potássio                                                                  | 7.20            |
| Sulfato de Magnésio                                                                  | 0.48            |
| Cloreto de Cálcio                                                                    | 1.70            |

|                                                                                   |                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Bicarbonato de Sódio                                                              | 9.00            |
| Fosfato de sódio monobásico e dibásico                                            | 12.00           |
| Fosfato de Potássio                                                               | 1.20            |
| Lactato de Sódio                                                                  | 1.50            |
| Glicose                                                                           | 1.00            |
| Glutamina                                                                         | 15 mg/mL        |
| AA 50X (B6766)                                                                    | 0.02 µL/mL      |
| AA 100X (M7145)                                                                   | 0.01 µL/mL      |
| Phenol Red                                                                        | 10 µg/mL        |
| Suplementação Protéica                                                            | ausente         |
| Coloração                                                                         | Laranja         |
| Veículo                                                                           | Água ultra-pura |
| Volume                                                                            | 100 mL*         |
| <b>Composição e características do estoque de meio PIV adquirido no comércio.</b> |                 |
| <b>7.6 HTF (IRVINE-Scientific®)</b>                                               |                 |
| Componente / HTF<br>(mM)                                                          | Concentração    |
| Cloreto de Sódio                                                                  | 97.8            |
| Cloreto de Potássio                                                               | 4.69            |
| Sulfato de Magnésio                                                               | 0.20            |

|                        |                     |
|------------------------|---------------------|
| Cloreto de Cálcio      | 2.04                |
| Bicarbonato de Sódio   | 25.0                |
| Glicose                | 2.78                |
| Piruvato de sódio      | 0.33                |
| Lactato de Sódio       | 21.4                |
| Sulfato de Gentamicina | 10 µg/mL            |
| Vermelho de fenol      | 10 mg/mL            |
| Suplementação Protéica | ausente             |
| Coloração              | Vermelho-alaranjado |
| Veículo                | Água ultra-pura     |
| Volume                 | 100 mL*             |
| Validade               | 64 dias             |
| Número do Catálogo     | 90125               |

## 8. TRABALHOS CIENTÍFICOS

**I.** Artigo científico a ser enviado para a Revista Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science ([www.scielo.br/revistas/bjvras](http://www.scielo.br/revistas/bjvras)).

**A morfologia dos ovócitos bovinos maturados *in vitro* está associada com a qualidade embrionária?**

The morfology of bovines oocytes *in vitro* maturated is associated with the quality embrionary ?

<sup>1</sup>Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu - SP

Sabrina Silveira ASSAF<sup>1</sup>  
Líliam Rigato MARTINS<sup>1</sup>  
Maria Denise LOPES<sup>1</sup>  
Eunice OBA<sup>1</sup>

**Palavras-chave:** maturação ovocitária, fêmeas bovinas, classificação  
morfológica, qualidade embrionária.

**Correspondência para:**  
MARIA DENISE LOPES  
Departamento de Reprodução Animal

### Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a taxa de maturação nuclear e desenvolvimento embrionário *in vitro* de ovócitos obtidos a partir de fêmeas bovinas abatidas em fase cíclica desconhecida considerando os critérios de classificação morfológica dos COCs. 145 COCs foram aspirados, classificados e maturados por 24 horas em meio TCM-199 com 10% SFB, 20mM HEPES, 0,5 µg/mL FSH, 0,03 UI/mL LH em temperatura de 38°C e 5% de CO<sub>2</sub> em ar. Na primeira etapa do experimento, os ovócitos foram distribuídos em 3 tratamentos (T): T1- COCs qualidade 1; T2 – COCs qualidade 2 e T3 – COCs qualidade 3 e 4. A avaliação da configuração cromossômica dos ovócitos maturados *in vitro* não indicou diferença estatística para maturação nuclear entre os graus de qualidade ovocitária. Na segunda etapa do experimento, os ovócitos foram maturados e fertilizados conforme os 3 tratamentos anteriores e o T4 – *pool* de COCs com todos os graus de qualidade. As médias de clivagem foram: T1 (18); T2 (16); T3 (11) e T4 (17) e mórula: T1 (14); T2 (11); T3 (4) e T4 (9). Os resultados indicaram que independente da classificação morfológica e do estágio do ciclo estral das fêmeas, os ovócitos co-cultivados após 24 horas tiveram capacidade de desenvolverem-se *in vitro* até o estágio de MII antes da fertilização em todos os tratamentos. Após a fertilização, apenas o T3 apresentou desenvolvimento embrionário inferior aos demais, indicando que ovócitos com graus de qualidade 3 e 4 não forneceram médias satisfatórias quando foram cultivados separadamente.

### Abstract

The aim of the present study was to investigate the morphology of oocytes categories for *in vitro* maturation and your effect in the developmental capacity of quality IVP embryos. 145 COCs were cultured for 24h, in TCM 199, containing 10% fetal bovine serum, 20mM HEPES, 0,5 µg/mL FSH, 0,03 UI/mL LH at 38°C and a moist atmosphere of 5% de CO<sub>2</sub>. After morphology categories selection the oocytes were distributed according with treatments (T): T1- COCs with quality 1; T2 - COCs with quality 2 and T3 – COCs with quality 3 and 4. The chromosomal configuration available in the *in vitro* oocytes matured don't resulted in statistical difference among treatments. In the second step of experiment, the oocytes were matured and fertilized according to three previous treatments and T4 – *pool of COCs* with everything grades. The clivage rates were: T1 (18); T2 (16); T3 (11) e T4 (17) and morule rates: T1 (14); T2 (11); T3 (4) e T4 (9). The results showed: independent morphological classification and female, the oocytes co-cultured after twenty-four hours had to developmental *in vitro* capacity into MII stage before fertilization time in every treatment. After fertilization, T3 alone presented embrionary developmental others different, indicating which oocytes quality grade 3 and 4 don't proving satisfactory rates in the separated culture.

**Key words:** *in vitro* maturation, bovine oocytes, morphology classification, development quality.

**II.** Artigo científico a ser enviado para a Theriogenology – Journal of Animal Reproduction (<http://www.elsevier.com>)

***In vitro* production of bovine embryos evaluating diferents buffer system in two gaseous atmospheres**

**S. S. Assaf <sup>a</sup>, F. C. Landim-Alvarenga <sup>a</sup>, Oba. E <sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP - Botucatu, SP, BRAZIL 18618

---

**Abstract**

The aim of the present study was to investigate the effect of different buffer systems in the pH stability of culture medium and in the developmental capacity of IVP embryos. After fertilization, the zygotes were cultivated according with treatments (T): T1- control group with NaHCO<sub>3</sub> in medium HTF

Irvine Scientific<sup>®</sup>; T2- group with 25 mM NaHCO<sub>3</sub> in medium SOFaa; T3 – group with 9mM NaHCO<sub>3</sub> and 4 mM HEPES in medium SOFaa and T4 – group with 9mM NaHCO<sub>3</sub> and 12 mM sodium phosphate in medium SOFaa. The embryos were exposed in two ambient: atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> + 5% O<sub>2</sub> + 90% N<sub>2</sub> at 39° C and atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> in air at 39° C and 100% humidity. The results obtained in this work showed that the addition of low concentration of HEPES to the culture media did not negative influence for blastocyst formation. Media buffering depends on the gaseous atmosphere utilized during culture and embryo development is sensitive to pH variation during culture, especially in bench manipulations. The pH stability obtained in these conditions didn't damage embryonic developmental and may be beneficial for embryo quality during cleavage rates evaluation and feeding when embryos were exposed to ambient atmosphere.

**Key words:** *in vitro* production; bovine embryos; culture; buffer system; gaseous atmosphere.

---

\* Corresponding author. Tel / fax.: +14 38116249.  
E-mail address: [assafss@yahoo.com.br](mailto:assafss@yahoo.com.br) (S.S.Assaf).