

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

**FONTES PROTÉICAS ALTERNATIVAS UTILIZADAS NOS
MEIOS DE CULTIVO DURANTE A PRODUÇÃO
IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS**

Tatiane Almeida Drummond Tetzner
Médica Veterinária

JABOTICABAL, SP - BRASIL

2011

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

FONTES PROTÉICAS ALTERNATIVAS UTILIZADAS NOS
MEIOS DE CULTIVO DURANTE A PRODUÇÃO
***IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Doutoranda: Tatiane Almeida Drummond Tetzner

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia

Co-orientadora: Dra. Christina Ramires Ferreira

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP Câmpus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

- 2011 –

Tetzner, Tatiane Almeida Drummond

Fontes protéicas alternativas utilizadas nos meios de cultivo durante a produção *in vitro* de embriões bovinos / Tatiane Almeida Drummond Tetzner. – – Jaboticabal, 2011
xxvi, 170 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011

Orientador: Joaquim Mansano Garcia

Banca examinadora: César Roberto Esper, Felipe Perecin, Karina Belotti Avelino, Paulo Henrique Franceschini

Bibliografia

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

CDU

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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

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

À descoberta do amor

*Ensaia um sorriso
e oferece-o a quem não teve nenhum.*

*Agarra um raio de sol
e desprende-o onde houver noite.*

*Descobre uma nascente
e nela limpa quem vive na lama.*

*Toma uma lágrima
e poussa-a em quem nunca chorou.*

*Ganha coragem
e dá-a a quem não sabe lutar.*

*Inventa a vida
e conta-a a quem nada compreende.*

*Enche-te de esperança
e vive á sua luz.*

*Enriquece-te de bondade
e oferece-a a quem não sabe dar.*

*Vive com amor
e fá-lo conhecer ao Mundo.*

Mahatma Gandhi

Dedico aos meus pais,
João Henrique Tetzner e Thelma Regina Almeida Drummond Tetzner,
por estarem sempre presentes em todos os momentos, por serem “exatamente
como são”, pelo carinho, pela dedicação constante e pelo
“amor infinito”.

Dedico à minha irmã **Talita,**
minha amiga, companheira, que nos presenteou com a **Júlia,**
alegria e bênção em nossas vidas.

Dedico aos meus avós,
Vô Rui e Vó Vera,
meus padrinhos, fonte de amor e de carinho, pela presença contínua e pelo
incentivo incondicional, pelos bons momentos da infância, da adolescência e da vida
adulta.

Dedico aos meus avós,
Vó Ilda e Vô Lotário,
exemplos de simplicidade e trabalho.

Dedico a toda minha família, em especial aos meus Tios
Arlindo, Marcos e Winston,
sempre presentes e amigos.

AGRADECIMENTOS

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

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

A pesquisadora **Dra. Christina Ramires Ferreira** pela co-orientação, amizade, ensinamentos, apoio e ajuda incondicional, sempre solícita e presente.

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

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela concessão da Bolsa de Estudos.

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

Ao professor **Dr. Felipe Perecin**, pela amizade, pelo companheirismo e pela enorme contribuição em estatística.

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

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

Às amigas muito especiais, **Naiara Zoccal Saraiva, Clara Slade Oliveira e Simone Cristina Méo Niciura**, pela força, incentivo, amizade, auxílio, sugestões, e por todos os ensinamentos, vocês foram essenciais nessa fase.

Aos amigos da **CRV LAGOA** pelo apoio, amizade e companheirismo.

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

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

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

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

APOIO FINANCEIRO

Esse projeto foi financiado pela **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, sob processo nº 04/12248-8, e pelo **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq**, no período de março de 2007 a agosto de 2010.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
ABREVIATURAS.....	xxiv
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1. INTRODUÇÃO	29
2. OBJETIVOS	32
2.2. Objetivos gerais.....	32
2.3. Objetivos específicos	32
4. REVISÃO DE LITERATURA	33
4.1. Histórico da PIV.....	33
4.2. Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos	35
4.3. Maturação <i>in vitro</i>	7
4.4. Fecundação <i>in vitro</i>	10
4.5. Desenvolvimento e viabilidade embrionária.....	11
4.6. Qualidade do embrião PIV	42
4.7. Patógenos em meios utilizados para produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	45
4.8. Risco de transmissão de doenças pelas técnicas de reprodução <i>in vitro</i>	22
4.9. Soro Fetal Bovino (SFB) como fonte de suplementação protéica na produção <i>in vitro</i> de embriões.....	51
4.10. Albumina Sérica Bovina (BSA) como fonte de suplementação protéica na produção <i>in vitro</i> de embriões	54

4.11. Macromoléculas quimicamente definidas utilizadas na produção <i>in vitro</i> de embriões.....	57
4.12. Definição, classificação e propriedades das Proteínas	59
4.13. Fluido embriônico bovino (FE).....	59
4.14. Substituto de soro (SS)	60
4.15. Knockout™ Serum Replacement (KSR) como fonte alternativa de suplementação protéica na produção <i>in vitro</i> de embriões	60
4.16. Ovalbumina (OVA)	62
4.17. Insulina + Transferrina + Selênio (ITS).....	63
 CAPÍTULO 2 - SUBSTITUIÇÃO DO SFB E BSA POR FONTES PROTÉICAS ALTERNATIVAS DURANTE A MIV E CIV DE EMBRIÕES BOVINOS.....	40
 1. INTRODUÇÃO	68
 2. MATERIAL E MÉTODOS	69
2.1. Experimento I: Influência da concentração de fluido embriônico (FE), substituto de soro (SS), conalbumina (C), e albumina fração VII (A) na maturação nuclear e na migração de grânulos corticais em oócitos bovinos.....	41
2.2. Experimento II: Avaliação da influência do SFB, FE e SS como suplementos protéicos na maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos.....	73
2.3. Experimento III: Avaliação da influência de diferentes fontes protéicas (SFB, FE, SS, OVA+ITS e K) utilizadas durante a maturação <i>in vitro</i> e sua consequência no desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	74
2.4. Experimento IV: Utilização de diferentes fontes protéicas (SFB, FE, SS, OVA+ITS e K) nas etapas de maturação, e cultivo <i>in vitro</i> e sua consequência no desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	77
2.5. Experimento V: Avaliação da influência de diferentes fontes protéicas (SFB, FE, SS, OVA+ITS e K) somente na etapa de cultivo <i>in vitro</i> e sua consequência no desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	78
2.6. Experimento VI: Verificação da qualidade embrionária através do número de células da MCI, do TF, e total nos embriões CIV.....	52

2.7. Experimento VII: Verificação da apoptose através de Coloração “Terminal Transferase Assay” – TUNEL.....	54
2.8. Experimento VIII: Avaliação da influência de diferentes fontes protéicas (SFB, FE, SS, OVA+ITS e K) na criopreservação de embriões bovinos	83
2.9. Análise estatística	84
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
3.1. Experimento I: Influência da concentração de fluido embriônico (FE), substituto de soro (SS), conalbumina (C), e albumina fração VII (A) na maturação nuclear e na migração de grânulos corticais em oócitos bovinos	85
3.1.1. Avaliação da maturação oocitária (maturação nuclear).....	85
3.1.2. Avaliação da maturação oocitária (maturação citoplasmática).....	90
3.2. Experimento II: Avaliação da influência do SFB, FE e SS como suplementos protéicos na maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos.....	96
3.3. Experimento III: Avaliação da influência de diferentes fontes protéicas (SFB, FE, SS, OVA+ITS e K) na maturação <i>in vitro</i> e sua consequência no desenvolvimento embrionário.....	73
3.4. Experimento IV: Avaliação da influência de diferentes fontes protéicas (SFB, FE, SS, OVA+ITS e K) nas etapas de maturação, e cultivo <i>in vitro</i> e sua consequência no desenvolvimento embrionário.....	79
3.5. Experimento V: Avaliação da influência de diferentes fontes protéicas (SFB, FE, SS, OVA+ITS e K) somente na etapa de cultivo <i>in vitro</i> e sua consequência no desenvolvimento embrionário.....	84
3.6. Experimento VI: Verificação da qualidade embrionária através do número de células da MCI, do TF, e total nos embriões CIV.....	91
3.7. Experimento VII: Verificação da apoptose através de Coloração “Terminal Transferase Assay” – TUNEL.....	97
3.8. Experimento VIII: Avaliação da influência de diferentes fontes protéicas (SFB, FE, SS, OVA+ITS e K) na criopreservação de embriões bovinos.	128
4. CONCLUSÕES.....	104

CAPÍTULO 3 – Utilização da técnica de ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-MS) para avaliação de oócitos maturados e embriões produzidos *in vitro* sob diferentes condições de suplementação durante a etapa de maturação *in vitro*.....105

1. INTRODUÇÃO.....105

2. REVISÃO DE LITERATURA.....108

3. OBJETIVO GERAL.....114

4. MATERIAL E MÉTODOS.....114

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....122

6. CONCLUSÕES.....140

7. REFERÊNCIAS.....141

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela I.1. Doenças ou agentes infecciosos em bovinos listados de acordo com o risco de transmissão via embriões (adaptado de IETS – “International Embryo Transfer Society”, 1998, SOOM, et al., 2008).....	21
Tabela II.1. Apresentação esquemática dos tratamentos utilizados na etapa de maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos (Experimento I).....	43
Tabela II.2. Apresentação esquemática dos tratamentos utilizados na etapa de maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos (Experimento II).....	46
Tabela II.3. Apresentação esquemática dos tratamentos utilizados na etapa de maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos.....	47
Tabela II.4. Apresentação esquemática dos tratamentos utilizados nas etapas de maturação e fecundação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos (Experimento III).....	48
Tabela II.5. Apresentação esquemática dos tratamentos utilizados nas etapas de maturação e fecundação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos (Experimento IV).....	50
Tabela II.6. Valores médios (% $\pm$ dp) de maturação nuclear (oócitos em metáfase II) após cultivo de maturação por 24 h, em meios suplementados com 5, 10 ou 15% de fluido embriônico (FE).....	59

Tabela II.7. Valores médios (% $\pm$ dp) de maturação nuclear (oócitos em metáfase II) após cultivo de maturação por 24h, em meios suplementados com 20, 40 ou 60 μ L/mL de substituto de soro (SS).....	59
Tabela II.8. Valores médios (% $\pm$ dp) de maturação nuclear (oócitos em metáfase II) após cultivo de maturação por 24h, em meios suplementados com 2, 4 ou 6 mg/mL de conalbumina (C).....	60
Tabela II.9. Valores médios (% $\pm$ dp) de maturação nuclear (oócitos em metáfase II) após cultivo de maturação por 24h, em meios suplementados com 2, 4 ou 6 mg/mL de albumina fração VII (A).....	61
Tabela II.10. Valores médios (% $\pm$ dp) de oócitos bovinos apresentando GC periféricos, como indício de maturação citoplasmática, após cultivo de maturação por 24 h, em meios suplementados com 5, 10 ou 15% de fluido embriônico (FE).....	63
Tabela II.11. Valores médios (% $\pm$ dp) de oócitos bovinos apresentando GC periféricos, como indício de maturação citoplasmática, após cultivo de maturação por 24 h, em meios suplementados com 20, 40 ou 60 μ L/mL de substituto de soro (SS).....	64
Tabela II.12. Valores médios (% $\pm$ dp) de oócitos bovinos apresentando GC periféricos, como indício de maturação citoplasmática, após cultivo de maturação por 24 h, em meios suplementados com 2, 4 ou 6 mg/mL de conalbumina (C).....	65
Tabela II.13. Valores médios (% $\pm$ dp) de oócitos bovinos apresentando GC periféricos, como indício de maturação citoplasmática, após cultivo de maturação por 24 h, em meios suplementados com 2, 4 ou 6 mg/mL	

de albumina fração VII (A).....	66
Tabela II.14. Valores médios (% $\pm$ dp) de maturação nuclear (oócitos em metáfase II) após cultivo de maturação por 24 h, em meios suplementados com 10%SFB (Controle), 10% FE e 20 μ L/mL de SS....	68
Tabela II.15. Valores médios (% $\pm$ dp) de oócitos bovinos apresentando GC periféricos, como indício de maturação citoplasmática, após cultivo de maturação por 24 h, em meios suplementados com 10%SFB (Controle), 10% FE e 20 μ L/mL de SS.....	69
Tabela II.16. Valores médios (% $\pm$ dp) das taxas de clivagem, produção de blastocistos e eclosão após maturação em meios suplementados com SFB, FE, SS, OVA+ITS e K.....	75
Tabela II.17. Valores médios (% $\pm$ dp) das taxas de clivagem, produção de blastocistos e eclosão após maturação e cultivo em meios suplementados com SFB, FE, SS, OVA+ITS e K.....	81
Tabela II.18. Valores médios (% $\pm$ dp) das taxas de clivagem, produção de blastocistos e eclosão após cultivo em meios suplementados com SFB, FE, SS, OVA+ITS e K.....	86
Tabela II.19. Valores médios do número de células totais por blastocisto avaliado e valores médios ($\pm$ dp) de apoptose em embriões produzidos <i>in vitro</i> com a utilização de fontes protéicas alternativas na MIV e CIV.	91
Tabela II.20. Valores médios do número de células totais por blastocisto avaliado e valores médios (% $\pm$ dp) de apoptose em embriões produzidos <i>in vitro</i> com a utilização de fontes protéicas alternativas na	

MIV e CIV.....	97
Tabela II.21. Valores médios (% $\pm$ dp) da taxa de eclosão após descongelação em meios suplementados com SFB, FE, SS, OVA+ITS e K.....	101
Tabela III.1. Apresentação esquemática dos tratamentos utilizados na etapa de maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos.....	117
Tabela III.2. Valores de m/z de lipídeos observados nos espectros de massas com suas respectivas possibilidades de atribuição e indicação das referencias que relataram a identificação estrutural por MS/MS.....	129

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura II.1. Modelo esquemático da PIV. A PIV foi realizada mediante maturação (MIV) durante 24 horas, fecundação (FIV) e cultivo (CIV) de 18 a 20 horas pós-inseminação (hpi). Decorridas 32 a 36 hpi foi realizada a contagem da taxa de clivagem, no D7 foi verificada a taxa de produção de blastocistos e no D8 e D9, avaliada a taxa de eclosão, com intuito de verificar os efeitos causados pelas diferentes fontes protéicas nas três etapas da PIV.....	52
Figura II.2. Aspecto morfológico da progressão nuclear em oócitos bovinos MIV por 24 h, corados com Hoechst 33342 e avaliados sob microscopia de epifluorescência. (a) Oócito imaturo, apresentando vesícula germinativa (VG); (b) Oócito maturo, apresentando metáfase II (M), com presença do primeiro corpúsculo polar (1CP).....	57
Figura II.3. Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de oócitos em metáfase II, após 24 h de maturação <i>in vitro</i>, em meios suplementados com 5, 10 e 15% de FE. ^{a,b,c}Colunas com sobrescritos diferentes, diferem entre si (P<0,05).....	58
Figura II.4. Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de oócitos em metáfase II, após 24 h de maturação <i>in vitro</i>, em meios suplementados com 20, 40 e 60 µL/mL de SS. ^{a,b,c}Colunas com sobrescritos diferentes, diferem entre si (P<0,05).....	59
Figura II.5. Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de oócitos em metáfase II, após 24 h de maturação <i>in vitro</i>, em meios suplementados com 2, 4 e 6 mg/mL de C. ^{a,b,c}Colunas com sobrescritos diferentes, diferem entre si (P<0,05).....	60

Figura II.6. Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de oócitos em metáfase II, após 24h de maturação <i>in vitro</i> , em meios suplementados com 2, 4 e 6 mg/mL de A.....	61
Figura II.7. Aspecto morfológico da distribuição dos grânulos corticais em oócitos bovinos MIV por 24h, corados com lecitina (específica a α -D-manose) conjugada a isotiocianato conjugado a fluoresceína (FITC), e avaliados sob microscopia de epifluorescência. (a) Oócito apresentando GC dispostos em “clusters” no citoplasma (oócito imaturo); (b) Oócito apresentando GC dispostos em todo o citoplasma, no centro e na periferia (oócito imaturo); (c) Oócito apresentando GC dispostos na periferia (oócito maturo).....	62
Figura II.8. Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de oócitos com grânulos corticais na periferia, como indício de maturação citoplasmática, após 24h de maturação <i>in vitro</i> , em meios suplementados com 5, 10 e 15% de FE. ^{a,b,c} Colunas com sobrescritos diferentes, diferem entre si ($P<0,05$).....	63
Figura II.9. Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de oócitos com grânulos corticais na periferia, como indício de maturação citoplasmática, após 24h de maturação <i>in vitro</i> , em meios suplementados com 20, 40 e 60 μ L/mL de SS. ^{a,b} Colunas com sobrescritos diferentes, diferem entre si ($P<0,05$).....	64
Figura II.10. Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de oócitos com grânulos corticais na periferia, como indício de maturação citoplasmática, após 24h de maturação <i>in vitro</i> , em meios suplementados com 2, 4 e 6 mg/mL de C. ^{a,b} Colunas com sobrescritos diferentes, diferem entre si ($P<0,05$).....	65

Figura II.11. Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de oócitos com grânulos corticais na periferia, como indício de maturação citoplasmática, após 24h de maturação <i>in vitro</i> , em meios suplementados com 2, 4 e 6 mg/mL de A. ^{a,b} Colunas com sobrescritos diferentes, diferem entre si ($P<0,05$).....	66
Figura II.12. Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de oócitos em metáfase II, após 24 h de maturação <i>in vitro</i> , em meios suplementados com 10%SFB (C), 10% FE e 20µL/ml SS. ^{a,b} Colunas com sobrescritos diferentes, diferem entre si ($P<0,05$).....	69
Figura II.13. Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de oócitos com grânulos corticais na periferia, como indício de maturação citoplasmática, após 24h de maturação <i>in vitro</i> , em meios suplementados com 10%SFB (C), 10% FE e 20µL/ml SS.....	70
Figura II.14. Representação gráfica da quantificação das taxas de clivagem sob diferentes suplementos protéicos na etapa de MIV.....	74
Figura II.15. Representação gráfica da quantificação das taxas de produção de blastocistos sob diferentes suplementos protéicos na etapa de MIV. ^{a,b} Colunas com sobrescritos diferentes, diferem entre si ($P<0,05$).....	74
Figura II.16. Representação gráfica da quantificação das taxas de eclosão dos embriões, sob diferentes suplementos protéicos na etapa de MIV.....	75
Figura II.17. Representação gráfica da quantificação das taxas de clivagem sob diferentes suplementos protéicos nas etapas de MIV e CIV.....	79
Figura II.18. Representação gráfica da quantificação das taxas de blastocistos expostos a diferentes suplementos protéicos nas etapas de MIV e CIV. ^{a,b} Colunas com sobrescritos diferentes, diferem entre si ($P<0,05$).....	80

Figura II.19. Representação gráfica da quantificação das taxas de eclosão dos embriões expostos a diferentes suplementos protéicos durante as etapas de MIV e CIV.....	80
Figura II.20. Representação gráfica da quantificação das taxas de clivagem, de produção de blastocistos, e taxas de eclosão dos embriões, sob diferentes suplementos protéicos nas etapas de MIV e CIV. ^{a,b} Colunas com sobrescritos diferentes dentro de cada categoria (clivagem, blastocisto, eclosão), diferem entre si ($P<0,05$).....	82
Figura II.21. Representação gráfica da quantificação das taxas de clivagem sob diferentes suplementos protéicos na etapa de CIV.....	84
Figura II.22. Representação gráfica da quantificação das taxas de produção de blastocistos sob diferentes suplementos protéicos na etapa de CIV. ^{a,b} Colunas com sobrescritos diferentes, diferem entre si ($P<0,05$).....	85
Figura II.23. Representação gráfica da quantificação das taxas de eclosão dos embriões, sob diferentes suplementos protéicos na etapa de CIV.....	85
Figura II.24. Representação gráfica da média do número de células da massa celular interna (MCI), nos blastocistos, sob diferentes suplementos protéicos nas etapas de MIV e CIV de produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos. ^{a,b} Colunas com sobrescritos diferentes dentro de cada categoria (MCI, TF, TOTAL), diferem entre si ($P<0,05$).....	92
Figura II.25. Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de células da MCI e do TF, em relação ao número total de células dos blastocistos produzidos sob diferentes suplementos protéicos nas etapas de MIV e CIV.....	93

Figura II.26. Fotomicrografia de blastocisto (sete dias após a FIV) avaliados pela técnica de coloração diferencial sob microscopia de epifluorescência. Azul (Hoechst 33342): núcleo das células da massa celular interna; Rosa (iodeto de propídeo + Hoechst): núcleo das células do trofoblasto.....	93
Figura II.27. Representação gráfica do número médio total de células em apoptose....	98
Figura II.28. Representação gráfica do número médio total de células em apoptose, presentes na MCI e TF, em relação ao número médio de células totais por blastocisto.....	98
Figura II.29. Blastocistos no dia 7, corados pela técnica de coloração TUNEL, observados em microscópio de epifluorescência. a) Blastômeros corados pelo Hoechst 33342; b) Células com fragmentação do DNA, com núcleo picnótico.....	99
Figura II.30. Representação gráfica da quantificação das taxas de eclosão dos embriões descongelados, sob diferentes suplementos protéicos.....	101
Figura III.1. Diagrama de funcionamento de um espectrômetro de massas (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005).....	106
Figura III.2. Espectrômetro de massas MALDI-TOF-MS. Um feixe de laser causa dessorção e ionização de moléculas (tanto da matriz quanto da amostra) depositadas em uma placa de metal. Uma vez transferidas para a fase gasosa, as moléculas carregadas são direcionadas eletrostaticamente da fonte de ionização para o analisador de massas. Analisadores “time-of-flight” (TOF) separam íons de acordo com sua relação massa/carga (m/z).....	109
Figura III.3. Estrutura básica de glicerolipídeos, glicerofosfolipídeos e esfingolipídeos detectados nos espectros de massas de oócitos e embriões bovinos. Pode-se observar a estrutura de um ácido graxo, o qual possui número variável de	

carbonos e diferentes graus de instauração (duplas ligações). Os ácidos graxos fazem parte da estrutura dos GL, GP e EL e são responsáveis pela grande variação de possíveis espécies lipídicas encontradas nestas classes (adaptado de Blanksby e Mitchell, 2010).....	110
Figura III.4. Espectros de massas que indicam TAG de um oócito imaturo, de um oócito maturado e de um blastocisto. Os espectros foram obtidos por espectrometria de massas por dessorção e ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) com matriz ácido 2,5,-dihidróxido benzóico (DHB) (FERREIRA <i>et al.</i> , 2009).....	114
Figura III.5. Com auxílio de estereomicroscópio os embriões são transferidos das placas de poliestireno até a placa de MALDI, onde cada embrião ocupa um “spot”. Antes da análise recobre-se o embrião com 1µL de solução de matriz orgânica, a qual auxiliará no processo de ionização de moléculas de lipídeo (fosfatidilcolinas, esfingomielinas e triacilgliceróis) presentes no embrião.....	120
Figura III.6. A figura ilustra o momento que o laser causa impacto ao embrião e fosfolipídeos são ionizados, gerando o espectro (adaptado de FERREIRA <i>et al.</i> , 2010).....	121
Figura III.7. Etapas de obtenção do perfil lipídico de embriões por MALDI-MS. A: Um único blastocisto bovino é colocado em um spot da placa de MALDI (96 ou 384 posições) com auxílio de estereomicroscópio, e recoberto pela matriz orgânica. B: Um feixe de laser dessorve e ioniza os lipídeos presentes no embrião, os quais são detectados pelo equipamento. O espectro de massas mostra as m/z na abscissa (eixo X) e a intensidade relativa na ordenada (eixo Y). C: Espectro MALDI-MS/MS do íon de m/z 810.6 mostrando perdas neutras de 59 Da em (a) e 183 Da (b) e os íons 184 Da (c) e 147 Da (d) fragmentos diagnósticos de fosfocolinas.....	123
Figura III.8. Espectros de massas contendo o perfil lipídico de oócitos dos seis grupos de MIV. Os espectros foram obtidos por MALDI-TOF MS com matriz DHB em	

modo positivo de ionização. (a) Grupo-OVA, (b) grupo-SFB (c) grupo-BSA, (d) grupo-FE, (e) grupo-SR, (f) grupo-K. (1) corresponde à região onde se encontra maior concentração de esfingomielinas e fosfocolinas e em (2) está a região do espectro de massas onde pode-se observar diversos valores de m/z correspondentes a TAG. Ver tabela III.1.....	125
Figura III.9. Gráfico de PCA considerando as amostras dos seis grupos experimentais (grupo-OVA, grupo-SFB, grupo-BSA, grupo-FE, grupo-SR e grupo-K) e indicando a porcentagem da variância explicada pelos componentes principais 1 e 2.....	132
Figura III.10. Gráfico de PCA considerando as amostras dos grupos OVA e BSA, mostrando a porcentagem da variância explicada pelos componentes principais 1 e 2.....	133
Figura III.11. Gráfico de PCA considerando as amostras dos grupos OVA e FE, mostrando a porcentagem da variância explicada pelos componentes principais 1 e 2.....	134
Figura III.12. Gráfico de PCA considerando as amostras dos grupos OVA e K, mostrando a porcentagem da variância explicada pelos componentes principais 1 e 2.....	135
Figura III.13. Espectros de massas de um único blastocisto do grupo suplementado durante a MIV com (a) OVA, (b) SFB, (c) FE e (d) SR.....	137
Figura III.14. Gráfico de PCA comparando o perfil lipídico de blastocistos dos grupos OVA (salientados com círculo vermelho), SFB, FE e SR, mostrando a porcentagem da variância explicada pelos componentes principais 1 e 2.....	138

Figura III.15. Gráfico de PCA comparando o perfil lipídico de blastocistos dos grupos OVA e SFB. Os embriões do grupo SFB dentro do círculo vermelho tiveram o perfil com maiores diferenças em relação ao grupo OVA. O Perfil lipídico da amostras indicada como O_2 está mostrado na figura III.11 (a) e o embrião SFB_4 na figura III.11 (b)..... 139

ABREVIATURAS

A	Analito
ANOVA	Análise de Variância
Bi	Blastocisto inicial
Bl	Blastocisto
Bls	Blastocistos
BSA	Albumina sérica bovina
Bx	Blastocisto expandido
°C	Grau Celsius
céls.	Células
CIV	Cultivo embrionário <i>in vitro</i>
CO ₂	Dióxido de Carbono
COC	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
CONT	Grupo Controle
CP	Corpúsculo polar
DHB	Ácido 2,5-di-hidroxibenzóico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão
EGF	"Epidermal growth factor"
ESI	Ionização por "electrospray"
FE	Fluido embriônico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
G	Gauge
GC	Grânulos corticais
GV	Vesícula germinativa
GVBD	Ruptura da vesícula germinativa
h	Horas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
hpi	Horas pós-inseminação
ITS	Insulina + transferrina + selênio
K	Knockout
LH	Hormônio luteinizante
LOS	Síndrome do bezerro gigante

M	Matriz
MALDI	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz
MALDI-TOF	Ion./dessorção de matriz por laser - tempo de voo
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MCI	Massa celular interna
MI	Primeira divisão meiótica
MII	Metáfase II
MFs	Microfilamentos
mg	Miligramas
min	Minutos
MIV	Maduração <i>in vitro</i>
MLI	Meio de lavagem e incubação
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	MiliMolar
MPF	Fator promotor de maturação
MS	Espectrometria de massas
MTs	Microtúbulos
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
n	Número
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
N ₂	Nitrogênio
OPU	Punção folicular guiada por ultra-som
OVA	Ovalbumina
O ₂	Oxigênio
PBS	Tampão salina fosfato
PHE	Penicilamina, hipotaurina e epinefrina
PIV	Produção <i>in vitro</i>
pMol	Picomol
PL	Fosfolipídeos
PN	Pronúcleo
PVA	Álcool polivinílico
PVP	Polivinil pirrolidona
SAS	“Statistical analysis system”
SB	Solução de bloqueio

seg	Segundos
SFB	Soro fetal bovino
SOF	Fluido sintético de oviduto
SS	Substituto de soro
SR	<i>"Serum replacement"</i>
T	Número total de células
TAGs	Triacilgliceróis
TALP	<i>"Tyrode's Albumin Lactate and Pyruvate"</i>
TCM-199	<i>"Tissue culture medium 199"</i>
TE	Transferência de embriões
TF	Trofoblasto
TN	Transferência nuclear
TOF	<i>"Time-of-flight"</i>
TUNEL	<i>"In situ terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick end labeling assay"</i>
UI	Unidade Internacional
UV	Ultravioleta
VG	Vesícula germinativa
VGBD	Quebra da vesícula germinativa
Zig	Zigoto
ZP	Zona pelúcida
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
%	Porcentagem
χ^2	Qui-quadrado

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

A biotécnica de produção *in vitro* de embriões (PIV)

Durante os últimos anos, a pecuária no Brasil obteve um enorme ganho de volume e produtividade. A aplicação de técnicas modernas de produção, incluindo as biotecnologias ligadas à reprodução animal, contribuiu para o destaque do país perante o mundo (LUCHIARI FILHO, 2006), e ainda, em condição de destaque dentro do contexto internacional relativo à produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos (THIBIER, 2002; FIGUEIREDO, GONÇALVES, VISINTIN, 2008).

O Brasil foi classificado como o primeiro país em volume de embriões produzidos *in vitro*, de acordo com o último relatório da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS). Essa atividade tornou-se intensa no país em razão da combinação de vários fatores, tais como o volume do rebanho bovino, a preponderância de raças zebuínas em grande parte do território nacional, e as condições de mercado no Brasil (PONTES *et al.*, 2009).

As biotecnologias aplicadas à reprodução animal vêm causando grandes impactos, principalmente nas últimas décadas. No entanto, até mesmo as biotécnicas mais complexas como a transferência nuclear (TN), ou clonagem, e a transgenia, ou manipulação genética, são dependentes da técnica básica de PIV de embriões.

A PIV de embriões bovinos vem sendo utilizada com perspectivas promissoras, tendo viabilizado o nascimento de um expressivo número de produtos (SENEDA *et al.*, 2002). A finalidade principal dessa biotecnologia é a multiplicação de animais que apresentam características genéticas (reais ou especulativas) de alto valor de mercado. Igualmente, embora em menor escala, o emprego da PIV também viabiliza programas de seleção em núcleos de rebanhos submetidos ao processo da técnica de MOET e teste de progênie (TP) (CAMARGO, 2002).

A PIV de embriões bovinos é uma ferramenta muito importante para o melhoramento genético animal, desde que utilizada com critério. Sendo assim, os avanços na bovinocultura podem ser acelerados com o uso dessa biotecnologia, com a finalidade de maior exploração reprodutiva de animais geneticamente superiores e de interesse zootécnico.

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

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

As barreiras sanitárias para comercialização de embriões bovinos produzidos *in vitro* são decorrentes da falta de controle dos produtos de origem animal que são utilizados como fontes de suplementação protéica, adicionados aos meios de cultivo (BAVISTER *et al.*, 1992). SFB e BSA são misturas complexas e não definidas de diferentes proteínas, possivelmente contendo vários pequenos peptídeos, substratos energéticos e fatores de crescimento que participam no desenvolvimento embrionário (KANE e HEADON, 1980; MENEZO *et al.*, 1982; KANE, 1985). Por outro lado, a albumina sérica bovina e o soro fetal bovino são preparados e purificados a partir de produtos derivados sanguíneos e, conseqüentemente, apresentam alto risco de contaminação por diversos patógenos (KRISHER e BAVISTER, 1999).

Alternativas à utilização de SFB e BSA têm sido buscadas por meio da utilização de macromoléculas sintéticas, como o álcool polivinílico (PVA) e a polivinil pirrolidona (PVP). Entretanto, os resultados obtidos com essas macromoléculas sintéticas são muito controversos com relação à quantidade e à qualidade de embriões produzidos *in vitro*.

A utilização de PVA em substituição à albumina no meio de cultivo embrionário promoveu redução nas taxas de desenvolvimento comparado aos sistemas suplementados com SFB e BSA (TAKAHASHI e FIRST, 1992; KESKINTEPE e BRACKETT, 1996; ECKERT *et al.*, 1998; KRISHER *et al.*, 1999; WRENZYCKI *et al.*, 1999), demonstrando que o desenvolvimento embrionário necessita de fatores encontrados no SFB para diferenciação e proliferação celular (LIM *et al.*, 1999a). Além disso, análises dos blastocistos cultivados com PVA revelaram alterações metabólicas (ECKERT *et al.*, 1998) e conteúdo protéico (THOMPSON *et al.*, 1998) comparado ao cultivo contendo albumina. Estudos comprovam que PVA não é capaz de sustentar a reação acrossomal e a fecundação, em várias espécies (BAVISTER *et al.*, 1992). Dessa maneira, Soria (2005) observou que os sistemas definidos de cultivo embrionário que utilizaram macromoléculas sintéticas produziram baixas taxas de blastocistos.

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

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

Assim, sistemas semidefinidos ou definidos, com diferentes fontes protéicas, livres de contaminantes e agentes patogênicos, poderão contribuir com consideráveis avanços na PIV de embriões bovinos.

2. OBJETIVOS

2.2. Objetivos gerais

Estudar os efeitos da substituição de proteínas derivadas sanguíneas da espécie bovina (SFB e BSA) por fontes protéicas alternativas, nas etapas de maturação e cultivo no sistema de produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos.

2.3. Objetivos específicos

- Definir quais as concentrações adequadas de fontes protéicas (fluido embriônico - FE, substituto de SFB – SS, conalbumina - C, albumina fração VII - A) a serem utilizadas nas etapas de MIV e CIV.
- Avaliar a influência de diferentes fontes protéicas (SFB, FE, SS, ovalbumina (OVA), knockout (K)) durante a MIV, quanto à maturação nuclear e a migração de grânulos corticais em oócitos bovinos, como indício de maturação citoplasmática.
- Verificar os efeitos da utilização das diversas fontes protéicas durante as etapas de maturação e cultivo *in vitro* e suas consequências no desenvolvimento embrionário *in vitro*, avaliando as taxas de clivagem, de produção de blastocistos, e de eclosão.
- Avaliar a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* por coloração diferencial entre as células da massa celular interna (MCI) e do trofoblasto (TF), contagem de células totais e avaliação da fragmentação de DNA, ou taxa de apoptose, produzida sob diferentes condições de meios de cultivo.
- Estudar o perfil lipídico de oócitos maturados *in vitro* e embriões produzidos *in vitro*, após exposição dos mesmos a diferentes fontes protéicas no decorrer do processo de PIV.

3. HIPÓTESES

- 1) Fontes protéicas alternativas podem ser utilizadas como substitutas ao SFB e BSA nas etapas de MIV e CIV de embriões bovinos.
- 2) Fontes protéicas alternativas como suplemento (FE, SS, C, A, OVA, K) no meio de maturação *in vitro* e cultivo embrionário promovem a diminuição do depósito de lipídeos citoplasmáticos, melhorando a resistência dos embriões ao processo de criopreservação.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Histórico da PIV

O primeiro bovino oriundo da biotécnica de produção *in vitro* de embriões (PIVE) nasceu em 9 de junho de 1981 nos EUA (Brackett *et al.*, 1982). Considerando o avanço da biotecnologia nas últimas décadas e difusão pelo mundo, a PIVE ocupa lugar de destaque na multiplicação e maior utilização das fêmeas geneticamente superiores nos rebanhos de leite e corte.

No final da década de 90 iniciou-se o uso comercial da biotécnica de PIVE, e a partir do ano de 2000 observou-se um contínuo e expressivo aumento na sua utilização em todo o território nacional, competindo dessa forma com a biotécnica de transferência de embriões (TE).

O Brasil atualmente ocupa um lugar de destaque no mundo quanto ao emprego de biotecnologias reprodutivas, principalmente por transferências de embriões produzidos *in vitro* (PIV), colocando-se na liderança mundial nessa biotecnologia reprodutiva.

De acordo com dados coletados em 22 países da Europa, foram produzidos *in vivo* 106.064 embriões, de 18.287 doadoras superovuladas, com uma média por doadora de 5,79 embriões, enquanto foram produzidos *in vitro* 6.569 embriões, em 3.471 sessões de OPU ("Ovum pick up"), com uma média por sessão de OPU de 1,89 embriões. Somados aos embriões produzidos através de ovários coletados em abatedouros, em um total de 2.626 embriões, totalizaram-se 9.195 embriões produzidos *in vitro* e número total de embriões foi de 123.739 (S. MERTON, 2008).

Na União Européia, o número de embriões transferidos obtidos por produção *in vivo* (TE), soma 97.292 (49.963 transferidos a fresco e 47.329 congelados). E o número de embriões produzidos *in vitro* (PIV) de 5.832 (2.404 transferidos a fresco e 3.428 congelados). Totalizando 108.841 embriões transferidos, proporção de PIV somente de 5,4%, enquanto a proporção de congelados transferidos pela técnica de TE é de 49,2% (S. MERTON, 2008).

Nos últimos quatro anos, o Brasil foi responsável por aproximadamente 25% da produção total e 50% da produção *in vitro* de embriões bovinos no mundo (VIANA e CAMARGO, 2007).

No Brasil, foram produzidos 57.368 embriões *in vivo* (TE) e 212.441 *in vitro* (PIV) no ano de 2007. Esses números garantem ao País a liderança mundial na produção *in vitro* de embriões bovinos, respondendo por 85% desse total, e uma participação de 32,8% no total geral, considerando os dois tipos, ou seja, as duas biotécnicas, TE e PIV. A América do Norte domina a produção *in vivo*, totalizando 52,2% do mercado. Os dados são da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) (THIBIER, 2007).

Essa evolução iniciou no ano de 2000, com o aumento gradual de embriões produzidos por essa biotécnica, e já em 2005, ocorreu uma inversão entre embriões produzidos pela técnica clássica de transferência de embriões (TE) e pela PIV e essa diferença aumentou significativamente nos anos subsequentes. Em 2006 foram transferidos 270.000 embriões bovinos no Brasil, segundo a Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE), sendo que deste total, aproximadamente 70.000 embriões foram produzidos por TE, e 200.000 embriões pela técnica de PIV,

representando mais de 74% os embriões obtidos pela técnica de PIV (VIANA e CAMARGOS, 2007). Essas estatísticas refletem o crescimento acelerado da biotécnica de PIV nos últimos anos em todo o território nacional, sendo assim consagrada comercialmente.

4.2. Produção *in vitro* de embriões bovinos

A produção *in vitro* (PIV) é considerada como a terceira geração de biotecnologias da reprodução animal, sendo a técnica de inseminação artificial (IA) considerada a primeira, e a biotécnica de transferência de embriões (TE) a segunda geração (THIBIER *et al.*, 1992).

A técnica de PIV expandiu-se nas diferentes espécies animais pouco tempo após o nascimento de Louise Brown em 1978, na Inglaterra, o primeiro bebê de proveta do mundo (STEPTOE e EDWARDS, 1978). Em 1982, nasceu o primeiro bovino produzido por fecundação *in vitro* (FIV) nos Estados Unidos (BRACKETT *et al.*, 1982), o que só foi possível graças às pesquisas iniciais desenvolvidas com animais de laboratório (VARAGO *et al.*, 2008).

Atualmente, a PIV de embriões compreende três etapas desenvolvidas em laboratório: a maturação oocitária *in vitro* (MIV), a fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo embrionário *in vitro* (CIV) até os estádios de mórula e blastocisto, quando os embriões podem ser transferidos para receptoras ou criopreservados (VARAGO *et al.*, 2008).

4.3. Maturação *in vitro*

Diversos fatores influenciam o êxito da PIV, dentre eles, as condições de realização da MIV. A maturação do oócito envolve transformações nucleares e citoplasmáticas possibilitando que o gameta feminino se torne apto a ser fecundado (GONÇALVES *et al.*, 2002) além de iniciar e sustentar o desenvolvimento embrionário. A aquisição dessa competência oocitária que ocorre na maturação envolve dentre

outras mudanças citoplasmáticas a transcrição de RNAm e a tradução de proteínas (SANTOS *et al.*, 2003).

A capacidade de oócitos mamíferos em maturar *in vitro* está correlacionada com a atividade ovariana, crescimento folicular e a presença ou ausência de células do *cumulus*, formando o complexo *cumulus*-oócito (COC), sendo esse último, necessário para o transporte de energia e promoção da maturação no oócito bovino.

Embora a simples remoção do oócito do folículo ovariano já induza sua maturação nuclear espontânea, não há completa aquisição de competência para o desenvolvimento, devido às falhas na maturação citoplasmática (ABEYDEERA *et al.*, 1998).

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

O tempo requerido para maturação *in vitro* pode variar entre as diferentes espécies (MINGOTI, 2005), sendo de 18-24 horas para bovinos (MERTON *et al.*, 2003), 28-36 horas para equinos (CARNEIRO, 2002), 30 horas para caprinos (SHARMA *et al.*, 1997) e de 48 horas para suínos (SOMFAI *et al.*, 2005).

O estoque de transcritos e proteínas no citoplasma do oócito é de fundamental importância para o processo de maturação e, principalmente, para assegurar o desenvolvimento embrionário inicial até o estágio de oito células (bovinos), quando o genoma embrionário é ativado, e a síntese de novas proteínas torna-se necessária (FERREIRA *et al.*, 2009). Essa fase é denominada transição materno-zigótica e a expressão de certos genes durante esse período determinará o sucesso da embriogênese no estágio de pré-implantação (MEIRELLES *et al.*, 2004).

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

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

O processo de maturação *in vitro* ocorre em aproximadamente 18 a 24 horas do seu início (GONÇALVES, 2007), e compreende a progressão do estágio de diplóteno da primeira prófase meiótica até a fase de metáfase II (GONÇALVES *et al.*, 2002). *In vivo*, o reinício da meiose ou maturação ocorre após o pico pré-ovulatório de LH durante o estro e, *in vitro*, a simples retirada do oócito do contato com as células foliculares é suficiente para dar início ao processo de maturação nuclear.

De acordo com Dode e Adona (2001), os oócitos que atingem o crescimento total completam a maturação nuclear, mesmo na ausência de substâncias estimuladoras. Com isso, ações para modificar o programa molecular do oócito devem acontecer antes do rompimento da vesícula germinativa (GVBD) (DODE e GRAVES, 2003).

Nos últimos anos, vários grupos de pesquisa vêm trabalhando com o intuito de aprimorar a maturação citoplasmática *in vitro* (GONÇALVES, 2007). Há grandes diferenças entre a maturação *in vivo* e *in vitro* em relação à competência oocitária, sendo que alguns estudos mostram disparidade a nível ultraestrutural. Essa diferença observada pode ser explicada pelas condições de cultivo usadas e também pela competência intrínseca do oócito (SIRARD e BLONDIN, 1996). Sabe-se que as condições de cultivo oferecem impacto ao desenvolvimento do embrião, mas a

qualidade intrínseca do oócito é o principal fator determinante da sua evolução. (LONERGAN e FAIR, 2008).

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

Os GC são grânulos secretórios de cálcio, capazes de promover o endurecimento da zona pelúcida (ZP) (CHERR *et al.*, 1988), e são responsáveis por auxiliar no bloqueio à polispermia (LIU *et al.*, 2003). A liberação do conteúdo desses grânulos provoca uma reorganização extensa da ZP e /ou reação cortical da superfície vitelina, resultando em alterações bioquímicas, e também na liberação de enzimas que provocam o endurecimento da ZP e inativação dos receptores espermáticos (ZP3) (FAIR *et al.*, 1997).

4.4. Fecundação *in vitro*

A etapa de FIV é a segunda etapa da biotécnica de PIV, e ocorre após 24 h de maturação *in vitro* dos oócitos.

Com o término da maturação, os oócitos são fecundados em um ambiente adequado, ocorrendo a retomada e término da meiose e os embriões se desenvolvem até o estágio de blastocisto (KUPKER *et al.*, 1998). A albumina sérica bovina (BSA) regula a fecundação *in vitro*, pois em meio com ausência de suplementação protéica há um retardo na formação de pronúcleos (ECKERT e NIEMANN, 1995), além de promover a remoção do colesterol da membrana plasmática do espermatozóide (ZENG *et al.*, 1995).

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

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

As proteínas mais abundantes encontradas no fluido do oviduto, ambiente no qual ocorre a capacitação do espermatozóide, a fecundação, o transporte embrionário e o desenvolvimento inicial embrionário, são a albumina e a imunoglobina G (LEESE, 1988).

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

4.5. Desenvolvimento e Viabilidade Embrionária.

Após a fecundação, ocorre o período de desenvolvimento embrionário, e embora a origem e qualidade do oócito sejam cruciais para o desenvolvimento até o estágio de blastocisto, o cultivo após a fecundação também exerce efeito na determinação da qualidade do embrião (BADR *et al.*, 2007 e MOORE *et al.*, 2007).

No período de desenvolvimento ou cultivo ocorrem sucessivas clivagens, ativação do genoma embrionário e eventos morfogênicos de compactação e

cavitação, que culminam com a formação do blastocisto (WATSON *et al.*, 2004). Portanto, o meio de cultivo embrionário *in vitro* deve conter uma composição baseada nos fluidos do útero e do oviduto durante o início da gestação (GONÇALVES *et al.*, 2002).

O sistema de desenvolvimento *in vitro* de embriões não apresenta a mesma eficiência que o sistema *in vivo* (VAN SOOM *et al.*, 1997). Estudos comparativos entre embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* mostram importantes diferenças na morfologia, estrutura, bioquímica, metabolismo e expressão de genes, que podem levar a menor capacidade de desenvolvimento embrionário *in vitro* (KNIJN *et al.*, 2003).

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

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

No metabolismo celular, durante o desenvolvimento embrionário, as espécies reativas de oxigênio (ROS), que incluem ânion superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radicais hidroxila (OH⁻), são constantemente liberadas do processo de quebra de ATP (FEUGANG *et al.*, 2004). A redução da concentração de O₂ para aproximadamente 5% durante o CIV pode reduzir a presença de radicais livres de oxigênio e diminuir os efeitos deletérios no DNA durante o desenvolvimento

embrionário, e resultar em maiores taxas de produção de blastocistos, com maiores quantidades de células (TAKAHASHI *et al.*, 2000).

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

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

A apoptose, ou morte celular programada, é característica no desenvolvimento de animais e plantas e é tão importante quanto o processo mitótico para a formação de um indivíduo. Ainda, é observada em condições normais no desenvolvimento de embriões *in vivo* e *in vitro* no início do desenvolvimento de embriões (NEUBER *et al.*, 2002). O índice de células em apoptose pode indicar a qualidade de blastocistos produzidos.

Uma série de eventos bioquímicos e morfológicos ocorre no núcleo e no citoplasma da célula em apoptose, ou morte celular programada. A condensação e fragmentação do DNA nuclear estão associadas com a peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas e também o aumento do retículo endoplasmático (HALL, 1990). O ensaio TUNEL, detecta células que iniciaram o processo de morte celular, pois a enzima terminal “deoxynucleotidyl transferase” (TdT) catalisa a incorporação de “biotinylated deoxyuridine” (dUTP) nos locais de quebra de DNA e o sinal é amplificado por fluorescência.

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

4.6. Qualidade do embrião PIV

A qualidade do embrião produzido *in vitro* interfere diretamente na utilização da biotécnica, visto que está diretamente correlacionado às taxas de concepção e de gestação.

Os principais fatores que mostram influência no desenvolvimento da gestação após a transferência de embriões PIV incluem: o sistema de cultivo embrionário, a qualidade do embrião, o número de embriões transferidos por receptora, a sincronia entre o desenvolvimento do embrião e o dia do ciclo estral da receptora, a técnica de transferência do embrião, o fato do embrião ser transferido a fresco ou após congelação/descongelação e efeitos do estresse térmico, tanto embrionário quanto sobre a receptora (HASLER, 1998, 2000; BOUSQUET *et al.*, 1999; FARIN *et al.*, 2001; HANSEN e BLOCK, 2004). Dentre esses fatores, a qualidade do embrião PIV foi considerado o fator mais crítico (LIM *et al.*, 2007).

Diversos trabalhos na literatura descrevem diferenças entre embriões produzidos no sistema *in vitro* e aqueles obtidos em sistema *in vivo*. Havlicek *et al.* (2009) compararam a produção e a qualidade embrionária a partir do cultivo inteiramente *in vitro* ou parcialmente combinado com o cultivo *in vivo* por diferentes períodos, através da transferência dos embriões para o oviduto de receptoras da espécie bovina. Os pesquisadores verificaram que os embriões que permaneceram por mais tempo *in vivo*, atingiram em sua maioria o estágio de blastocisto no dia 8. Além disso, o cultivo *in vivo* possibilitou maior criotolerância, mostrando assim que o sistema *in vitro* ainda carece de muitas pesquisas e estudos para que mimetize o desenvolvimento embrionário *in vivo*.

A principal limitação no sistema de PIV é quanto à criopreservação dos embriões (LONERGAN *et al.*, 2003; RIZOS *et al.*, 2003). A biotécnica de criopreservação é uma ferramenta que permite o armazenamento de material biológico por tempo indeterminado sem que o mesmo perca sua atividade funcional, permitindo, portanto, a conservação do germoplasma animal (SIQUEIRA FILHO, 2009).

Marcantes diferenças observadas nas características morfológicas e funcionais entre embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* são responsáveis pela baixa criotolerância e menor taxa de prenhez após a transferência de embriões PIV criopreservados. Há vários dados indicativos de baixa qualidade de blastocistos PIV é fortemente influenciada pelas condições de cultivo (WRIGHT e ELLINGTON, 1995; THOMPSON, 1997; CROISER *et al.*, 2001), principalmente, quanto ao ambiente de cultivo pós-fertilização (RIZOS *et al.*, 2002).

Oócitos criopreservados apresentam variações ultraestruturais, tais como a distribuição anormal de cromossomos e microtúbulos ou a desorganização do fuso, com o consequente risco de perda cromossômica e também possibilidade de aneuploidia (MORATO *et al.*, 2008).

Os embriões também sofrem alterações estruturais, e a utilização do soro fetal bovino tem sido apontada como um dos fatores responsáveis pela ineficiência da técnica, por resultar em um grande acúmulo de lipídeo no embrião (LEIBO E LOSKUTOFF, 1993). Abe *et al.* (1999), demonstraram em seus resultados, um acúmulo de gotas lipídicas no citoplasma dos embriões produzidos com soro (SFB) e o estudo de Moore *et al.* (2007) evidenciou que a ausência de soro no cultivo dos embriões bovinos pode aumentar a taxa de sobrevivência dos mesmos após a congelação/descongelação.

A criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vivo* permite a obtenção de resultados de prenhez próximos aos obtidos com embriões transferidos a fresco, principalmente utilizando o método clássico de congelação (HASLER, 2003). No entanto, quando se trabalha com embriões produzidos *in vitro* (PIV) os resultados são insatisfatórios (AGCA *et al.*, 1998; TOMINAGA, 2004; SEIDEL, 2006).

Desde o primeiro relato de congelamento de embrião de bovino por Wilmut *et al.* (1973) inúmeros são os trabalhos de pesquisa visando melhorar os métodos e resultados da biotécnica de criopreservação. A abordagem mais comum para lidar com as baixas taxas de sucesso de embriões PIV é modificar os procedimentos de congelação e/ou soluções de congelação. Outra abordagem possível é modificar o conteúdo de lipídeos dos embriões por delipidação e/ou uso de diferentes aditivos no meio de cultivo (DIEZ *et al.*, 2001; SEIDEL, 2006). As melhorias na criopreservação de embriões são muitas vezes limitadas e, especialmente os diferentes aditivos no cultivo, como o soro, podem ter efeitos negativos no desenvolvimento e na criopreservação de embriões.

Embriões produzidos *in vitro* apresentam uma série de características diferentes dos embriões produzidos *in vivo*. Além da maior quantidade de lipídeos, há um menor grau de compactação (VAN SOOM *et al.*, 1992), o disco embrionário é menor (IWASAKI *et al.*, 1990), e ocorrem junções incompletas entre células do trofoblasto (TF) e massa celular interna (MCI) (SHAMSUDDIN *et al.*, 1992).

Havlicek *et al.* (2009) também mostraram diferenças na cronologia do desenvolvimento de embriões cultivados *in vitro* versus *in vivo*. Embriões que foram cultivados mais dias nos ovidutos (ou seja, *in vivo*) se desenvolveram mais lentamente, atingindo o estágio de blastocisto geralmente no dia 8, enquanto embriões produzidos *in vitro* normalmente alcançam esse estágio no dia 7 de cultivo. Esse fenômeno já foi descrito por Van Soom *et al.* (1993, 1997). Os autores mostraram que há uma prolongada transição *in vivo* do estágio de mórula para blastocisto compara à transição que ocorre no processo *in vitro*. Os embriões produzidos *in vitro* alcançam esse estágio já na sexta divisão de clivagem, que pode ser devido a uma incompleta compactação durante o estágio de mórula (VAN SOOM *et al.*, 1997).

No sistema *in vitro*, a suplementação com soro tem uma influência significativa na duração dos ciclos celulares dos embriões (HOLM *et al.*, 2002). Esses autores observaram que a adição de soro durante a etapa de cultivo *in vitro* (CIV) afetou a cinética de desenvolvimento embrionário, levando a diminuição da duração do quarto ciclo celular, que foi acompanhada por uma blastulação prematura.

Embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* diferem no perfil de expressão gênica, na morfologia e ultraestrutura, atividade metabólica e na cinética de desenvolvimento (STURMEY *et al.*, 2008). O meio de cultivo (principalmente o soro) é tido como grande responsável pela alteração observada na expressão dos principais genes envolvidos nos eventos do desenvolvimento inicial, como compactação e blastulação (NIEMANN e WRENZYCKI, 2000).

Lonergan *et al.* (2003) mostraram que a reduzida criotolerância de blastocistos produzidos *in vitro* é acompanhada por alteração na expressão de alguns genes, como o Bax (ligado à morte celular ou apoptose) e outros genes de interesse. Foi observado nesse estudo que dentro de apenas 10 h de cultivo *in vitro*, já há diferenças evidentes em transcritos desses genes, que ainda permanecem alterados no estágio de blastocisto.

4.7. Patógenos em meios utilizados para produção *in vitro* de embriões bovinos

Com o aumento da comercialização de embriões, houve a preocupação com o aspecto sanitário dos mesmos. Vários métodos de prevenção são utilizados para se obter embriões livres de patógenos específicos, iniciando com testes para as enfermidades dos animais doadores e receptores até o tratamento do embrião após a colheita. No entanto, as biotécnicas representam um desafio para o controle da transmissão de doenças, pois produzem novos ambientes, manipulação excessiva do material, maior chance de contaminação e disseminação de patógenos (STRINGFELLOW, GIVENS, WALDROP, 2004).

A albumina sérica bovina (BSA) e o soro fetal bovino (SFB) são as principais fontes protéicas utilizadas no cultivo embrionário *in vitro*, constituindo a base de meios indefinidos utilizados na PIV. Porém, o meio de cultivo suplementado com BSA e SFB é uma fonte potencial para transmissão de vírus, príons e até mesmo outros agentes patogênicos, que podem contaminar o embrião diretamente (AVERY *et al.*, 1993; SPRINGFELLOW *et al.*, 1995).

Obviamente, em condições normais em um animal saudável, os gametas e embriões se desenvolvem sem a presença de qualquer microorganismo patogênico. Entretanto, em animais infectados por bactérias ocorre um tropismo para o trato genital, onde pode ocorrer a infecção embriônica como consequência. Também durante a manipulação do embrião durante a transferência, a bactéria pode entrar em contato com a zona pelúcida ou através das soluções de meios utilizados e causar a infecção (GIVENS *et al.*, 2008).

A albumina sérica bovina (BSA) e o soro fetal bovino (SFB) são preparados e purificados a partir de produtos derivados sanguíneos e, conseqüentemente, apresentam altos riscos de contaminação por diversos agentes patogênicos, como bactérias, parasitas (HEMPHILL *et al.*, 2000) e vírus: vírus do herpes bovino tipo 1 (BHV-1), e o vírus da diarreia bovina e vírus (BVDV), vírus da leucemia bovina (BTV) (GUERIN *et al.*, 1988), e príons, como o da encefalopatia espongiforme bovina (BSE) (BATT *et al.*, 1991; KRISHER *et al.*, 1999), descritos na Tabela I.1. Além disso, assim como o co-cultivo, essas fontes protéicas podem introduzir componentes tóxicos ao meio de cultivo e alterar a produção *in vitro* de embriões (KRISHER e BAVISTER, 1999).

O herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) é considerado um agente patogênico aos embriões de uma forma geral e, tem sido detectado em alguns produtos biológicos utilizados para a produção *in vitro* de embriões bovinos (VANROOSE, KRUIF, VAN SOOM, 2000).

A necessidade de melhores esclarecimentos sobre a interação vírus-oócito durante a MIV tem levantado questões concernentes ao potencial de risco de transmissão desse agente infeccioso pelo gameta feminino. Dessa forma, torna-se relevante a avaliação da infectividade e o efeito do BHV-1 sobre oócitos bovinos, durante o período de MIV. Acredita-se, que a compreensão sobre a patogenia do BHV-1 está diretamente relacionada ao gameta feminino, e que possa auxiliar no controle sanitário, contribuir para o aumento da eficiência de técnicas reprodutivas, e abrir portas para o comércio exterior.

O BHV-1 é considerado um dos mais importantes patógenos de bovinos, e está associado a sérias manifestações clínicas tanto em rebanhos de corte quanto de leite, sendo responsável por grandes prejuízos econômicos aos países que exploram a bovinocultura como atividade econômica. Encontra-se amplamente disseminado em rebanhos de praticamente todo o mundo, com exceção de alguns poucos países da Europa, como Dinamarca e Suíça, devido à implementação de um rígido e detalhado programa de erradicação da infecção (KIRKBRIDE, 1985; ACKERMANN; WEBER, 1994).

Além dos impactos econômicos gerados pela introdução do BHV-1 em rebanhos bovinos, tais como o comprometimento no crescimento de animais, redução na produção leiteira, morte embrionária e fetal, eficiência reprodutiva de fêmeas e touros reduzida, tratamento dos animais com sinais clínicos, entre outros, há ainda as restrições ao comércio internacional de animais vivos e seus produtos como sêmen, embriões e produtos de biotecnologia, descritas no Código de Saúde de Animais Terrestres (OIE, 2004).

Com o advento de técnicas bem sucedidas de produção *in vitro* e criopreservação de embriões e oócitos bovinos, aumentou-se não só o comércio interno e externo destes produtos, como também a preocupação com as questões concernentes aos riscos de transmissão de enfermidades infecciosas (BIELANSKI *et al.*, 1997).

Durante os últimos anos foi demonstrado que o BHV-1 pode estar presente tanto no material utilizado no sistema de produção *in vitro* de embriões (VANROOSE *et al.*, 1999), como presente no líquido folicular, e até mesmo associado às células epiteliais de oviduto nas fêmeas (BIELANSKI *et al.*, 1993), e nos espermatozóides de touros infectados com o vírus (ROCHA *et al.*, 1998). Portanto, o risco de ocorrência dessa enfermidade por meio de transmissão *in vitro* de embriões deve ser considerado alto, uma vez que o vírus pode estar presente também em animais aparentemente saudáveis.

Uma vez que a mortalidade embrionária e a mortalidade fetal têm um grande impacto na rentabilidade de qualquer sistema de produção animal, torna-se necessário o aprimoramento contínuo de métodos de controle sanitário do rebanho e das biotécnicas ligadas à reprodução.

Atualmente, sabe-se que a PIV, além de uma importante biotécnica, constitui-se como uma ferramenta valiosa para estudos de interações de gametas e/ou embriões com patógenos e/ou xenobióticos e, com isso, torna-se cada vez mais um excelente modelo não somente para averiguações sobre aspectos sanitários, como também relacionados a processos tóxicos.

Com o aumento da comercialização de embriões PIV, intensifica-se a preocupação pelo aspecto sanitário de embriões. Vários métodos de prevenção são utilizados para se obter embriões livres de patógenos específicos e assim, assegurar a sanidade.

As recomendações do WOA (World organisation for animal health) estão descritas em um manual da IETS publicado em 1998 (IETS; <http://www.iets.org/>). E o controle sanitário oficial para os embriões destinados a transporte internacional está regulamentado pelo *“Terrestrial animal health code of the world organisation of animal health”* (http://www.oie.int/eng/normes/mcode/code2006_back/en_chapitre_3.3.1.htm).

As biotécnicas representam um desafio para o controle da transmissão de doenças, pois produzem novos ambientes, promovem manipulação excessiva do material e aumentam a oportunidade de contaminação e de disseminação de patógenos (STRINGFELLOW *et al.*, 2004).

Tabela I.1. Doenças ou agentes infecciosos em bovinos listados de acordo com o risco de transmissão via embriões (adaptado de IETS – “International Embryo Transfer Society”, 1998, SOOM *et al.*, 2008).

Categoria	Agente da doença
1 – Doenças e agentes com evidência suficiente que ocorrem, e para mostrar o risco de transmissão é imprescindível proceder de forma que os embriões sejam cuidados desde a coleta até a transferência (<i>in vivo</i>)	Vírus da leucemia bovina (BLV) Vírus da doença dos pés e boca (bovinos) Vírus língua-azul (BTV) <i>Brucella abortus</i> Herpesvírus bovino tipo-1 (BHV-1) (requer tripsina) Encefalopatia espongiforme bovina (BSE)
2 – Idêntico a categoria 1 mas com transferência adicional e é necessário verificar a existência	Nenhum
3 – Doenças ou agentes patogênicos com evidências preliminares indicando o risco da transmissão da doença e sendo necessário providências com os embriões antes da transferência, mas com adições experimentais <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de substâncias	Vírus da imunodeficiência bovina (BIV) Vírus da peste bovina (RV) Vírus da diarreia viral bovina (BVDV) <i>Histophilus somnus</i> <i>Mycobacterium paratuberculosis</i> <i>Neospora caninum</i> <i>Campylobacter fetus (subspecies venereal)</i>
4 – Doenças ou agentes patogênicos com trabalhos preliminares que foram conduzidos ou estão em progresso, que indicam: a) Não existem conclusões se são possíveis serem transmitidos com o nível alto de risco de transmissão, b) O risco ou a via de transmissão por embriões podem não estar propriamente de acordo com o manual da IETS.	Vírus Akabane (AV) Anaplasmoze bovina Enterovírus bovino (BEV) Herpesvírus bovino tipo-4 (BHV-4) <i>Chlamydophila psittaci</i> <i>Escherichia coli</i> 09:K99 <i>Leptospira borgpetersenii</i> serovar <i>hardjobovis</i> <i>Mycobacterium bovis</i> <i>Parainfluenza-3 virus</i> <i>Trichomonas foetus</i> <i>Ureaplasma- Mycoplasma species</i> Vesicular stomatitis vírus (VSV)

4.8. Risco de transmissão de doenças pelas técnicas de reprodução *in vitro*

A partir do momento que a TE se tornou comercial, muitas questões relacionadas ao risco de transmissão de patógenos, principalmente aqueles associados à reprodução, foram levantadas (VANROOSE *et al.*, 2000). No que diz respeito à sanidade dos embriões de PIV, pouco têm sido publicado e não se sabe ao certo qual a interação de diferentes patógenos com os gametas e/ou embriões *in vitro*.

Atualmente, para que ocorra a transmissão de doenças infecciosas, seja por embriões produzidos *in vivo* ou por embriões produzidos *in vitro*, o patógeno deve estar presente dentro do embrião (infecção embrionária verdadeira), em associação ou aderido à zona pelúcida, considerada um dos principais pontos de resistência aos patógenos, ou presente nos fluidos no qual os embriões são recolhidos, manipulados, criopreservados ou transferidos (WRATHALL, 1995).

São consideradas fontes comuns de contaminação, os gametas e seus fluidos associados, células somáticas utilizadas na maturação e/ou manutenção dos embriões, materiais de origem animal utilizados para suplementação dos meios de cultura (ex: soro fetal bovino e albumina sérica bovina), contaminação do profissional, de instrumentos ou equipamentos, meios de lavagem e o próprio transporte de embriões. Sobretudo, o agente deve estar presente ao menos na concentração mínima requerida para a infecção de uma receptora suscetível (GALUPPO, 2005).

A zona pelúcida (ZP) é uma matriz extracelular única, originada quase que exclusivamente de células foliculares, que envolve o oócito, e também o embrião em sua fase inicial. Confere especificidade na fertilização, bloqueio a poliespermia e proteção durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário. A maioria dos patógenos é incapaz de penetrar a zona pelúcida intacta e infectar as células dos embriões, portanto, ela tem sido considerada uma barreira efetiva aos patógenos, de forma, recomenda-se apenas o uso de embriões com a ZP íntegra, sendo esta uma característica crítica na determinação do estado de sanidade dos embriões (STRINGFELLOW; GIVENS, 2000).

A natureza da aderência e de como a zona pelúcida atrai e carrega o agente infeccioso ainda é desconhecida. Sabe-se que apesar da maioria dos agentes patogênicos não atravessar a zona pelúcida intacta, alguns deles, principalmente vírus, podem aderir-se sobre essa estrutura. Dessa forma, pode haver a infecção do embrião, no momento de sua eclosão, e a infecção da receptora, quando o embrião juntamente com o patógeno aderido for transferido (RUFINO *et al.*, 2006).

A pesquisa específica sobre a interação de patógenos com embriões tem se limitado principalmente a agentes virais, dentre eles o BHV-1, causador da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR). Esse agente está entre os agentes infecciosos mais importantes devido aos transtornos reprodutivos ocasionados em bovinos. A IBR é uma doença infecciosa economicamente importante, de grande transmissibilidade e difícil controle, que está amplamente disseminada nos rebanhos bovinos de corte e de leite tanto do Brasil como em outros países (RICHTZENHAIN *et al.*, 1999; MÉDICI; ALFIERI; ALFIERI, 2000; FLORES *et al.*, 2005).

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

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

A adição de soro em meios de cultivo geralmente melhora a taxa de produção de blastocistos (GOMES e DIEZ, 2000) e seu efeito tem caráter bifásico, ou seja, inibe as primeiras divisões celulares, mas estimula o desenvolvimento embrionário posterior (GOMEZ *et al.*, 2008). Porém, tanto o SFB quanto a BSA, são misturas complexas e indefinidas de proteínas, fatores de crescimento, peptídeos e outros elementos (LIM *et al.*, 2007).

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

O uso do soro no cultivo também altera o metabolismo do embrião e pode levar ao aumento do conteúdo de ácidos graxos nos blastocistos (REIS *et al.*, 2003). A suplementação com soro tem sido associada ao acúmulo de gotas lipídicas no citoplasma de embriões PIV (ABE *et al.*, 1999) e pode levar a baixos resultados de sobrevivência após criopreservação dos mesmos (LEIBO *et al.*, 1993). Além disso, o soro pode aumentar a frequência de embriões mixoplóides (LONERGAN *et al.*, 2004) e pode induzir a alterações no perfil de expressão gênica (LAZZARI *et al.*, 2002; WRENZYCKI *et al.*, 1999; RIZOS *et al.*, 2002).

Contudo, embriões produzidos *in vitro*, utilizando-se soro como suplementações do meio, mostram alterações na sua ultraestrutura, blastulação anormal e compactação prejudicada (GOMEZ *et al.*, 2008). Também pode estar relacionado à transmissão da Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB), ou mal da Vaca Louca (BATT *et al.*, 1991), e da Diarréia Viral Bovina (BVDV) (STRINGFELLOW *et al.*, 1997), além de impossibilitar o estabelecimento das reais necessidades nutricionais do embrião, por conter uma variedade indefinida de substâncias, com concentrações variáveis, dependendo da procedência. Para resolver esses problemas, meios definidos têm sido propostos e estudados.

Rizos *et al.* (2003) relataram que o meio de cultivo SOF suplementado com soro reduziu a criotolerância, bem como alterou a abundância relativa de importantes mRNAs em embriões bovinos vitrificados. Um fato interessante que foi observado é que o meio contendo soro aumentou o tamanho (2-6 e > 6 mm) e número de gotas lipídicas em embriões bovinos PIV, porém aqueles produzidos em meio livre de soro apresentaram gotas lipídicas de menor tamanho (2 mm) (WRENZYCKI *et al.*, 2005). Esse acúmulo de lipídeo pode reduzir a criotolerância, e consequentemente a sobrevivência após a descongelação.

SFB e BSA são as fontes protéicas mais comumente utilizadas como suplemento do meio de cultura para produção *in vitro* de embriões bovinos (MINGOTI, 2000). No entanto, estudos indicam que o uso do SFB tem sido superior ao BSA como suplemento protéico adicionado ao meio de MIV, durante a etapa de maturação oocitária, pois foi demonstrada maior viabilidade dos oócitos e maior expansão das células do *cumulus* (LEIBFRIED-RUTLEDGE *et al.*, 1986; SANBUISSHO e THRELFALL, 1988; ANCIOTO, 2004). É provável que mais de um fator seja responsável pela variação que existe na capacidade de diferentes fontes protéicas em dar suporte ao desenvolvimento *in vitro* de embriões. Diversos aspectos relacionados ao processo de maturação *in vitro* dos oócitos podem interferir no desenvolvimento embrionário, dentre eles, a deficiência na maturação citoplasmática (LEIBFRIED-RUTLEDGE *et al.*, 1987).

Atualmente, estão sendo realizados estudos que visam a exclusão do soro no processo de PIV de embriões. O desenvolvimento de um meio de cultivo livre de soro para embriões de animais domésticos é altamente desejável para facilitar estudos do desenvolvimento embrionário inicial e para aumentar a eficiência dos procedimentos de MIV, FIV e CIV (GARDNER *et al.*, 1994), além de evitar os possíveis danos por ele causado (MOORE *et al.*, 2007). Ainda, condições químicas definidas, sem o soro ou derivados do soro, permitem observação mais precisa dos efeitos de fatores do crescimento ou outros fatores embriotróficos presentes no meio de cultivo (GILES e FOOTE, 1997; SIRISATHIEN *et al.*, 2003; OYAMADA *et al.*, 2004).

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

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

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

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

Assim como o SFB, a albumina sérica bovina (BSA) é uma das fontes protéicas mais comumente utilizadas como suplemento do meio de cultura para produção *in vitro* de embriões bovinos (MINGOTI, 2000). Entretanto, estudos mostram que o soro fetal

bovino (SFB) tem sido superior ao BSA como suplemento protéico no meio de MIV, demonstrado pela viabilidade e expansão das células do *cumulus* (COC's) (LO TURCO, 2004).

Thompson (2000) mostrou claramente o papel da BSA como substância nutritiva durante o desenvolvimento, especialmente no período de pós-compactação embrionária. Embora a BSA tenha um efeito benéfico no desenvolvimento *in vitro*, é difícil elucidar funções específicas dos fatores de crescimento ou outros estimulantes porque se trata de uma mistura de vários componentes, como proteínas, fatores de crescimento, peptídeos e outras substâncias.

Os riscos de agentes infecciosos e patogênicos presentes na BSA são bem menores quando comparado ao SFB. Embora esses produtos nunca tenham sido testados e declarados totalmente livres de patógenos. Algumas alternativas para substituição da BSA durante o cultivo *in vitro* e criopreservação estão sendo utilizadas, como substâncias químicas com propriedades surfactantes (PALASZ *et al.*, 1995), e até mesmo as macromoléculas de origem não-animal como peptonas vegetais (GEORGE *et al.*, 2006).

A albumina sérica bovina geralmente é utilizada como fonte de proteína em meios de cultivo e também por promover efeitos benéficos durante o desenvolvimento embrionário com a sua propriedade de ligação, pois dessa forma protege os embriões contra componentes tóxicos presentes nos meios de cultura (FLOOD e SHIRLEY, 1991). A BSA ainda possui a capacidade de quelar metais pesados e equilibrar o pH (MEHTA e KIESSLING, 1990), e também a propriedade surfactante, previne adesão de células a superfícies plásticas e de vidro (BAVISTER, 1981; PINYOPUMINTR e BAVISTER, 1994).

In vivo, uma das principais funções do BSA é servir como transportador de nutrientes (JOHANSON, 1981). *In vitro*, ela tem sido utilizada em meios de cultura substituindo o SFB. Entretanto, meios que contêm BSA, ainda que livres de ácidos graxos, de globulinas e com poucas endotoxinas, são considerados semidefinidos, pois podem conter outras proteínas e diversos contaminantes, além da variabilidade dos sistemas de cultivo (KRISHER *et al.*, 1999). A BSA beneficia a clivagem dos embriões,

porém parece ter deficiência de elementos estimuladores do desenvolvimento de blastocistos (THOMPSON, 2000), resultando em menor desenvolvimento embrionário, quando utilizada como fonte protéica isolada.

A albumina, normalmente, é necessária para auxiliar a capacitação espermática e a fecundação *in vitro*, mas os mecanismos dessa ação ainda não são bem compreendidos. O preparo comercial de albumina sérica é contaminado com uma variedade de outras proteínas e compostos, sendo sua atividade biológica variável (KANE e HEADON, 1980; FLOOD e SHIRLEY, 1991).

Preparações comerciais de albumina sérica são contaminadas com outras proteínas, bem como com ácidos graxos e outras moléculas pequenas (KANE e HEADON, 1980; BATT e MILLER, 1988). As pequenas moléculas contaminantes incluem fatores embriotróficos de crescimento, os quais estimulam a divisão celular e o desenvolvimento de mórulas e blastocistos (KANE, 1985). Até mesmo diferentes lotes de albumina sérica bovina da mesma fonte diferem na composição, especialmente no que se relaciona aos valores de ácidos graxos (CHEN, 1966), promotores e fatores de crescimento, e a capacidade de dar suporte ao desenvolvimento embrionário, em várias espécies (KANE, 1985).

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

Visconti *et al.* (1995) executaram diferentes testes e ensaios experimentais para determinar quais fatores eram necessários para: capacitação espermática, reação acrossomal e capacidade de formação de pronúcleo. Na ausência de BSA, eles descobriram que a proteína de fosforilação da tirosina 95/116 hexoquinase era limitada

e que à medida que a concentração de BSA era aumentada, a intensidade da proteína de fosforilação de tirosina aumentava, revelando o valor máximo perto de 3 mg/mL de BSA.

A fonte protéica BSA pode ser considerada um componente variável do meio de MIV visto que a preparação comercial apresenta um produto quimicamente impuro. Por essa razão, qualquer meio de maturação contendo BSA comercial não pode ser considerado definido quimicamente (KANE, 1987). Em diversos estudos a BSA é amplamente utilizada durante a PIV na substituição ao SFB, principalmente na etapa de fecundação *in vitro*.

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

Devido às possíveis contaminações por patógenos (vírus e príons), além dos efeitos tóxicos em meios de cultura com adição de fontes protéicas de origem sanguínea, tem sido proposta e preconizada a substituição de SFB e BSA por macromoléculas quimicamente definidas, ou macromoléculas sintéticas (THOMPSON, 1999; THOMPSON, 2000), como por exemplo a polivinil pirrolidona (PVP) ou o álcool polivinílico (PVA).

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

Meios de cultura definidos são essenciais para a compreensão das necessidades nutricionais de oócitos e embriões (LIU e FOOTE, 1995; GANDHI *et al.*, 2000), bem como para o estudo de substâncias adicionadas ao meio de cultura, que poderão promover incremento e melhoria nos índices da biotécnica de PIV de embriões (GESHI

et al., 2000). No entanto, embriões cultivados em meios totalmente definidos, apresentaram bloqueio no desenvolvimento (CAMOUS *et al.*, 1984), redução da viabilidade, em comparação aos cultivados em meios suplementados com SFB e BSA (WRIGHT e BONDIOLI, 1981; PINYOPUMMINTR e BAVISTER, 1994; KIM *et al.*, 1996; KESKINTEPE e BRACKETT, 1996).

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

Thompson (1999) observou que o nível de proteína total e a utilização de substratos energéticos são baixos em blastocistos cultivados em meio suplementado com PVA, quando comparado àqueles cultivados em meio suplementado com SFB ou BSA. Dessa forma, o PVA não tem sido muito empregado como suplemento em meios de cultura, pois a habilidade de desenvolvimento adquirida pelo oócito durante o processo de maturação é originária, em grande parte, pela síntese de proteínas que ocorre nas primeiras etapas do desenvolvimento, sendo importante para as etapas seguintes (SIRARD *et al.*, 1998).

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

desenvolvimento e taxas de eclosão semelhantes aos que utilizam SFB (GANDHI *et al.*, 2000).

Lim *et al.* (2007) obtiveram resultados satisfatórios com o uso da macromolécula PVA somente quando também foram acrescentados ao meio mio-inositol, fator de crescimento epidermal (EGF), além de se alterar a composição do substrato de energia, ou seja, adicionando-se glicose ou fosfato ao meio de cultivo. Com o meio definido contendo PVA-mio-inositol-EGF-fosfato, os autores relataram produção de até 52% de produção de blastocistos, e relataram alteração na expressão de alguns genes importantes ligados à viabilidade e sobrevivência embrionária.

4.12. Definição, classificação e propriedades das Proteínas

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

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

4.13. Fluido embriônico bovino (FE)

O fluido embriônico, "*embryonic fluid*" é uma fonte protéica. De acordo com a descrição do fabricante, é um composto de fatores de crescimento e também de hormônios enriquecidos em um fluido utilizado como suplemento para cultivo celular e suas diversas aplicações.

É uma fonte de fatores de crescimento bovino. Pode substituir o SFB ou outros soros com resultados comparáveis em muitas aplicações.

O “*Embryonic fluid Sigma E1761*” é estéril, líquido, testado quanto a endotoxinas, e indicado para cultivo celular.

4.14. Substituto de soro (SS)

O substituto do soro, “serum replacement” é uma fonte protéica estável durante 30 dias quando diluído em meio de cultura. É um meio definido, que pode ser utilizado para múltiplos propósitos, usualmente em estudos de efeitos dos fatores de crescimento e também de produção de proteínas.

O SS é obtido através de alta purificação, com tratamento de calor da albumina sérica bovina, e também transferrina e insulina bovina. Não contém fatores de crescimento, hormônios esteróides, glucocorticóides, fatores de adesão de células, Ig detectável e agentes mitogênicos. Pode ser utilizado em cultivo celular e suspensão de células.

O “*Serum replacement (50X) Sigma S0638*” é estéril, líquido, testado quanto a endotoxinas, e indicado para cultivo celular.

4.15. Knockout™ Serum Replacement (KSR) como fonte alternativa de suplementação protéica na produção *in vitro* de embriões

O Knockout™ Serum Replacement (KSR) é também apontado como uma alternativa de fonte protéica no meio de cultivo *in vitro* livre de soro.

O KSR é um suplemento sintético, de fórmula definida, que contém aminoácidos, glicose, insulina, transferrina, antioxidantes, sais inorgânicos, proteínas e vitaminas (MOORE *et al.*, 2007), e por não conter fatores de crescimento e hormônios já vem sendo utilizado como substituto do soro em meio de cultivo de células-tronco embrionárias (CHENG *et al.*, 2004).

O Knockout foi inicialmente utilizado como substituto do soro fetal bovino no cultivo de células tronco embrionárias (GOLDSBOROUGH *et al.*, 1998), que por sua vez, são células derivadas da massa celular interna de embriões (MCI) no estágio de blastocisto.

Embriões gerados *in vivo* não entram em contato com soro fetal bovino. Portanto, não é surpresa que alguns componentes do mesmo sejam prejudiciais. Para resolver esses problemas, substitutos do soro disponíveis comercialmente têm sido testados extensivamente, principalmente nos meios de cultivo utilizados para embriões humanos (MOORE *et al.*, 2007). Porém, em bovinos, os substitutos de soro têm produzido resultados variáveis (DUQUE *et al.*, 2003; SAGIRKAYA *et al.*, 2007).

A suplementação com KSR permite a proliferação das células-tronco embrionárias enquanto as mesmas mantêm sua pluripotência (MOORE *et al.*, 2007). Em estudos preliminares, foi observado o potencial da utilização do knockout durante o cultivo de embriões produzidos *in vitro* em substituição ao soro fetal bovino (SFB) (RODRIGUEZ-SALLABERRY *et al.*, 2002 e SERAPIÃO *et al.*, 2005).

Segundo Moore *et al.* (2007), apesar do KSR provocar detrimientos ao oócito quando usado na maturação, não houve diferença significativa entre o desenvolvimento dos blastocistos cultivados em meio suplementado com KSR ou com SFB. Ainda, no mesmo estudo, revelou-se que embriões cultivados em meios suplementados com KSR e posteriormente vitrificados mantiveram alta taxa de sobrevivência 24h após serem aquecidos, ou seja, descongelados, enquanto aqueles suplementados com SFB tiveram uma baixa taxa de sobrevivência após serem descongelados (valor aproximado de 70% e 30%, respectivamente).

Infelizmente, a composição química do KSR não está disponível, porém, ele é comercializado como um suplemento sintético livre de soro e sabe-se que ele contém diversos aminoácidos, glicose, insulina, transferrina, antioxidantes, sais inorgânicos e uma mistura de proteínas e vitaminas. O KSR não contém fatores de crescimento, citocinas, hormônios, imunoglobulinas ou as macromoléculas PVA ou PVP. Sua formulação assegura boa reprodutibilidade no cultivo (MOORE *et al.*, 2007).

Como já mencionado, é necessário desenvolver alternativas para a substituição do SFB, alcançando resultados satisfatórios de produção e qualidade embrionária, quantitativa e qualitativa, porém, sem os riscos biológicos que o SFB atualmente oferece. Diante das qualificações da BSA nas etapas de PIV e das poucas pesquisas que envolvem o KSR no cultivo embrionário bovino (MOORE *et al.*, 2007), é possível que estes dois suplementos, juntamente, proporcionem novos êxitos na produção embrionária.

4.16. Ovalbumina (OVA)

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

A separação da ovalbumina, assim como das albuminas séricas, ou outras proteínas sanguíneas é realizada por eletroforese ou precipitações fracionadas com vários sais (BAHR e JOHNSON, 1991). A OVA é a maior proteína constituinte da parte branca do ovo, ou seja, da clara. Participa com 54% da constituição de toda a porção branca do ovo, juntamente com os outros constituintes: ovomucóide (11%), ovotransferrina (13%), lisozima (3,5%), além de globulina e avidina. Possui aproximadamente 3% de carboidratos (BESLER e MINE, 1999).

A OVA é considerada uma fosfoproteína (o grupo prostético é o ácido fosfórico) com 386 aminoácidos (44kD) com um N ligante à cadeia de oligossacarídeos, sendo a síntese de OVA estimulada principalmente pelo hormônio estrógeno (BAHR e JOHNSON, 1991). A ovalbumina é uma das 30 proteínas diferentes que formam o albume, e contém todos os aminoácidos essenciais.

Acredita-se que a formação do albume esteja sob controle hormonal (hormônios estrogênicos, androgênicos e progesterônicos), mecânico e nervoso fazendo com que as células glandulares do magno (também chamada glândula albumínifera) secretem e

depositem os extratos sobre a gema que no seu trajeto gira sobre seu eixo. O ovo em formação percorre o magno em cerca de 3 horas (BURKE, 1996).

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

De acordo com Barlian *et al.* (1993), a ovalbumina é um suplemento protéico não aparentado ao BSA, mas que também possui a capacidade de manter a proliferação celular. Além disso, por ser de origem heteróloga (aves), os riscos de transmissão de doenças aos bovinos são menores.

A OVA foi utilizada como fonte protéica alternativa (TETZNER, 2007) nas etapas de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* de embriões bovinos, e resultou em menor quantidade de embriões (26%) produzidos *in vitro* quando comparado ao grupo controle, com presença de SFB e BSA (45%), avaliados o número de blastocistos sobre o número de clivados. Embora tenha apresentado resultados biológicos inferiores quando comparado ao SFB e BSA, nas etapas de fecundação e nas etapas finais do desenvolvimento, a OVA pode ser uma fonte protéica importante e promissora pelo fato de representar menores riscos de contaminações por patógenos, pelo fato de ser de origem heteróloga. Dessa forma os riscos de transmissão de agentes patogênicos aos bovinos são menores, principalmente nos casos específicos de entraves correlacionados à exportação de embriões e às barreiras sanitárias internacionais, já que os meios quimicamente definidos também apresentam baixa eficiência.

4.17. Insulina + Transferrina + Selênio (ITS)

O complexo ou mistura insulina, transferrina e selênio (ITS) tem sido reportado em diversos estudos de produção *in vitro* de embriões que promove melhorias nas taxas de maturação oocitária e também nas taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Na tentativa de aperfeiçoar os resultados obtidos pela PIV de embriões, alguns aditivos foram testados nas diversas etapas do processo, como: substratos energéticos, fatores de crescimento, aminoácidos (WATSON *et al.*, 2000), estimuladores da síntese de glutathione (DE MATOS *et al.*, 1996, 2002; GASPARRINI *et al.*, 2000, 2003; AVELINO *et al.*, 2004), além de outros agentes antioxidantes, como: transferrina, lactoferrina, vitaminas E e C e taurina (LIM e HANSEL, 2000).

Aditivos como a insulina melhoram o desenvolvimento embrionário de mamíferos pré-implantação, pelo controle do transporte de glicose, e exercem ações mitogênicas e anti-apoptóticas, pois o transporte deste substrato de energia é essencial para a sobrevivência do embrião (AUGUSTIN *et al.*, 2003); além disso, estimulam também o transporte de aminoácidos pela membrana celular do embrião (McGOWAN *et al.*, 1995) e aumentam a síntese de proteínas (LEWIS *et al.*, 1992).

A adição de insulina ao meio de CIV de embriões bovinos elevou a taxa de clivagem e de produção de blastocisto, além de aumentar o número de células por blastocisto e reduzir a frequência de apoptose, melhorando assim a qualidade embrionária (AUGUSTIN *et al.*, 2003).

Outros fatores podem ser adicionados ao meio de cultivo associados à insulina, como selênio, que age como estimulador da síntese de glutathione, além de ser embriotrófico (LIM e HANSEL, 2000). Há a possibilidade de se utilizar transferrina, que foi identificada como um dos maiores constituintes protéicos nas células da granulosa e no fluido folicular e ampolar, e tem ação quelante de radicais hidroxila, facilitando o transporte de ferro e outros metais para dentro do embrião (LIM e HANSEN, 2000).

De acordo com os estudos de Camargo *et al.* (2001), a adição de vitaminas e de ITS ao meio suplementado com BSA não aumentou a taxa de produção de blastocistos, e também quando utilizaram ITS e vitaminas separadamente em meio de cultivo com SFB, os resultados foram semelhantes e também não aumentou a taxa de produção de

blastocistos. Esse fato pode ser atribuído a diferenças nas necessidades biológicas de embriões bovinos em relação às espécies estudadas.

Matsui *et al.* (1995), ao utilizarem ITS na concentração de 1%, observaram ação estimulatória no desenvolvimento de embriões bovinos. Este trabalho utilizou 50 ml de vitaminas e ITS, o que pode representar um excesso ou uma deficiência dessas substâncias no desenvolvimento embrionário. Além disso, BSA pode apresentar contaminação por vitaminas (BAVISTER, 1995), alterando a concentração final no meio.

4.18. Apoptose

A palavra apoptose (do grego *apo* = separação, *ptôsis* = queda), adotada pela primeira vez na década de 70, designa a forma fisiológica de morte celular (KERR *et al.*, 1972 apud TILLY, 1996).

O termo apoptose define todos os mecanismos e processos envolvidos antes, durante e depois da morte celular: (1) indução da morte celular – estímulos externos; (2) morte celular propriamente dita – desencadeamento de mecanismos morfológicos e bioquímicos; e (3) absorção dos corpos apoptóticos por células vizinhas. Já a utilização da terminologia morte celular programada (MCP) envolve apenas os mecanismos morfológicos e bioquímicos específicos que a própria célula desencadeia para induzir a sua morte (KERR *et al.*, 1972 apud TILLY, 1996).

Apoptose, ou morte celular programada (MCP) é característica no desenvolvimento de animais e plantas e é tão importante quanto o processo mitótico para a formação de um indivíduo. É observada em condições normais no desenvolvimento de embriões *in vivo* e *in vitro* do início de desenvolvimento de embriões (NEUBER *et al.*, 2002). O índice de células em apoptose pode indicar a qualidade de blastocistos produzidos.

A MCP é regulada por uma sequência de eventos bioquímicos intracelulares e apresenta como principais características, alterações morfológicas no núcleo (fragmentação do DNA ordenada em 200 pares de base pela endonuclease) e no citoplasma (picnoses); ainda, o citoplasma se torna denso, com corpos apoptóticos e

vesículas, e com aumento do retículo endoplasmático e da permeabilidade da membrana mitocondrial, este último elemento é o fator central durante o processo. Estes efeitos deletérios nas células (dano no DNA, peroxidação lipídica e oxidação de proteínas) são causados pelos peróxidos que desencadeiam a apoptose (HALL, 1999; VAN SOOM *et al.*, 2002).

O êxito do desenvolvimento embrionário depende de um adequado funcionamento de genes. A qualidade de oócitos tem um grande impacto na competência do desenvolvimento e contribui para altas incidências de perdas embrionárias (HARDY, 2001). A sobrevivência do oócito é controlada por várias moléculas regulatórias da morte celular programada (JURISCOVA, 2004).

A MCP é um processo fundamental para a embriogênese, assim como para a homeostase tecidual, desenvolvimento de animais, morfogênese de órgãos, e até mesmo para a remoção de células infectadas ou danificadas em todos os organismos multicelulares (JOZA, 2001). O aparecimento de fragmentação celular durante o desenvolvimento dos embriões foi observado em diferentes espécies (JURISCOVA, 1995; LONG, 1998; MATWEE, 2000).

Os embriões com fragmentação celular apresentam blastômeros de tamanhos diferentes, retardo no desenvolvimento, seguido de degeneração. A fragmentação dos blastômeros e de seu DNA foi associada à morte celular programada (HARDY, 1989).

Estudos mostraram que a apoptose é um processo normal e que ocorre em 100% dos blastocistos de bovinos produzidos *in vitro* (BYRNE *et al.*, 1999). A mitocôndria possui papel fundamental no processo de MCP mediante liberação do citocromo c e fator indutor de apoptose (AIF), que ativam pró-caspases 2, 3 e 9 (SCHPEPINA, 2002).

O número de células embrionárias e o percentual de MCP são usuais indicadores da qualidade embrionária. Quanto maior o número de células e menor a taxa de MCP, melhor é a qualidade do blastocisto. O embrião pode apresentar MCP em blastômeros inviáveis, durante a formação da blastocela ou ainda em condições de estresse (HANDYSIDE e HUNTER, 1986; BYRNE *et al.*, 1999; VAN SOOM *et al.*, 2002).

Uma serie de eventos bioquímicos e morfológicos ocorre no núcleo e no citoplasma da célula em MCP. A fragmentação do DNA nuclear está associada com a peroxidação lipídica e oxidação de proteínas e aumento do reticulo endoplasmático (HALL, 1990).

O ensaio ou técnica “*in situ terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick labeling assay*”(TUNEL), detecta células que iniciaram o processo de morte celular, pois a enzima terminal “deoxynucleotidyl transferase” (TdT) catalisa a incorporação de “biotinylated deoxyuridine” (dUTP) nos locais de quebra de DNA e o sinal é amplificado por fluorescência, ou seja, a enzima TdT adiciona nucleotídeos biotinilados marcados com fluoresceína no local de quebra da fita de DNA da célula em apoptose, podendo ser visualizada por microscopia de epifluorescência (YUAN *et al.*, 2003).

CAPÍTULO 2 – SUBSTITUIÇÃO DO SFB E BSA POR FONTES PROTÉICAS ALTERNATIVAS DURANTE A MIV E CIV DE EMBRIÕES BOVINOS

1. INTRODUÇÃO

A espécie bovina é comumente empregada para aplicação e desenvolvimento de biotecnologias, principalmente com objetivo de melhoria da produção animal e da eficiência reprodutiva (USHIJIMA, 2005).

Nos últimos quatro anos, o Brasil foi responsável por aproximadamente 25% da produção total e 50% da produção *in vitro* de embriões bovinos no mundo (VIANA e CAMARGO, 2007). No Brasil, foram produzidos 57.368 embriões *in vivo* (TE) e 212.441 *in vitro* (PIV) no ano de 2007. Esses números garantem ao país a liderança mundial na produção *in vitro* de embriões bovinos, respondendo por 85% desse total, e uma participação de 32,8% no total geral, produzidos por TE e PIV.

Estudos na área de PIV são necessários para acelerar e incrementar os resultados atuais, pois as pesquisas em todas as etapas, como maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) de embriões bovinos, são extremamente importantes para a evolução da biotécnica em questão, bem como para fornecer suporte às outras biotecnologias reprodutivas mais complexas e sofisticadas, como a transferência nuclear (TN) e até mesmo para a transgenia, ou manipulação genética.

Atualmente, o principal problema em se utilizar soro fetal bovino (SFB) e albumina sérica bovina (BSA) na produção *in vitro* de embriões bovinos refere-se às barreiras sanitárias, pois essas duas substâncias, por serem produtos derivados sanguíneos, e ainda da própria espécie bovina, representam alto risco de contaminação e transmissão de doenças, demonstrando ser um dos principais fatores limitantes na comercialização desses embriões (TORNESI *et al.*, 1993; MILHAM *et al.*, 1994).

Faz-se necessário o conhecimento sobre substâncias que exerçam a mesma função na suplementação protéica, e que possam substituir o SFB e BSA nas etapas de maturação, fecundação e cultivo *in vitro*, pois assim será possível diminuir ou extinguir os riscos de contaminações.

O objetivo deste trabalho foi utilizar diferentes fontes protéicas durante a MIV e CIV para obtenção de um protocolo eficiente, que permita a exclusão do SFB e da BSA em importantes etapas do processo de PIV, como maturação oocitária e cultivo embrionário *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Produção *in vitro* de embriões do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, durante o período de agosto de 2007 a março de 2010.

Para a realização dos experimentos laboratoriais, foram utilizados ovários de fêmeas bovinas abatidas em frigorífico, sendo o abatedouro localizado em cidade próxima ao laboratório da UNESP.

Exceto quando mencionado, os reagentes e meios foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). As estufas foram calibradas para a temperatura de 38,5° C com 5% CO₂ em ar e umidade máxima durante todos os experimentos.

2.1. Experimento I: Influência da concentração de fluido embrionico (FE), substituto de soro (SS), conalbumina (C), e albumina fração VII (A) na maturação nuclear e na migração de grânulos corticais em oócitos bovinos

Neste experimento, avaliaram-se os efeitos da substituição do soro fetal bovino (SFB) por diferentes concentrações de fluido embriônico (FE), substituto de soro (SS), conalbumina (C), e albumina fração VII (A), na maturação nuclear quanto ao estágio de progressão nuclear, e na maturação citoplasmática, quanto à distribuição dos grânulos corticais (GC), por representarem um índice de maturação citoplasmática. Foi realizada a padronização da concentração adequada de cada substituto, a qual foi utilizada nos experimentos seguintes.

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

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

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

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

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

- e) Desnudo: sem camadas do *cumulus* e com ooplasma uniforme ou com granulações.

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

2.1.2. Maturação *in vitro*

Os oócitos foram maturados *in vitro* (MIV) em meio TCM 199 com sais de Earle (Gibco 31.100; Grand Island, NY, EUA) suplementado de acordo com os tratamentos (FE, SS, C, e A), descrito na Tabela II. 1, e 1,0µg/mL de FSH (Pluset®, Calier), 50UI/mL de hCG (Profasi®, Serono), 1,0µg/mL de estradiol (Sigma E-2758), 0,2mM de piruvato de sódio (Biochemical 44094) e 83,4µg/mL de amicacina (Biochimico).

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

Maturação –MIV	Suplementação
FE	Fluido embrionário (5,10 e15%) – (Sigma, E1761)
SS	Substituto de soro (20, 40 e 60 µL/mL) – (Sigma, S0638)
C	Conalbumina (2, 4 e 6 mg/mL) – (Sigma, C7786)
A	Albumina fração VII (2, 4 e 6 mg/mL) – (Sigma, A7641)

FE = fluido embrionário; SS = substituto de soro; C = conalbumina; A = albumina fração VII.

2.1.3. Avaliação da maturação oocitária

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

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

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

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

Os oócitos foram classificados quanto à maturação nuclear pelo estágio de progressão nuclear, e foram considerados maduros quando no estágio de MII. Quanto à maturação citoplasmática, os oócitos foram classificados de acordo com a distribuição

dos GC, sendo considerados imaturos aqueles com GC dispostos em “clusters” distribuídos por todo o citoplasma; parcialmente maduros ou em transição, os oócitos com GC migrando para a periferia; e maduros os oócitos com GC dispostos na periferia de forma homogênea; de acordo com a classificação de HOSOE e SHIOYA (1996) e MÉO (2002).

Após o estabelecimento da melhor concentração de cada fonte protéica ou substituto, essa foi adotada nos experimentos seguintes.

2.2. Experimento II: Avaliação da influência do SFB, FE e SS como suplementos protéicos na maturação *in vitro* de oócitos bovinos

Neste experimento; avaliou-se a influência da substituição do soro fetal bovino (SFB) por FE e SS na maturação nuclear quanto ao estágio de progressão nuclear, e na maturação citoplasmática, quanto à distribuição dos grânulos corticais (GC). Foram escolhidos somente esses dois substitutos, ou fontes protéicas, pois em estudos prévios (Experimento I) foram os mais eficientes na MIV quando comparados aos demais.

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

A metodologia para obtenção, seleção e maturação *in vitro* dos oócitos bovinos foi desenvolvida como anteriormente, descrita no item 2.1.1., com exceção da suplementação protéica utilizada na etapa de MIV.

Os oócitos foram maturados *in vitro* (MIV) em meio TCM 199 com sais de Earle (Gibco 31.100), suplementado de acordo com os tratamentos: SFB (Crypion®; 10% SFB), FE (Sigma®; 10% FE), SS (Sigma®; 20µl/mL), conforme a Tabela II. 2, e 1,0µg/mL de FSH (Pluset®, Calier), 50µg/mL de hCG (Profasi®, Serono), 1,0µg/mL de estradiol (Sigma E-2758), 0,2mM de piruvato de sódio (Biochemical 44094) e 83,4µg/mL de amicacina (Biochimico), durante 24h à temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

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

Maturação –MIV	Suplementação
Controle	SFB (10%) - (Crypion®)
FE	Fluido embriônico (10%) - (Sigma, E1761)
SS	Substituto do soro (20µl/mL) - (Sigma, S0638)

FE = fluido embriônico; SS = substituto de soro.

2.2.2. Avaliação da maturação oocitária

A metodologia para avaliação dos oócitos bovinos maturados sob diferentes suplementos protéicos descritos acima foi desenvolvida como descrito anteriormente no item 2.1.2.

2.3. Experimento III: Avaliação da influência de diferentes fontes protéicas (SFB, FE, SS, OVA+ITS e K) utilizadas durante a maturação *in vitro* e sua consequência no desenvolvimento embrionário *in vitro*

Neste experimento, avaliou-se a influência da substituição do SFB por fontes protéicas alternativas durante a etapa de MIV.

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

A metodologia para obtenção, seleção e maturação *in vitro* dos oócitos bovinos foi desenvolvida como anteriormente, descrita no item 2.1.1., com exceção da suplementação protéica utilizada na etapa de MIV, de acordo com a tabela II.3.

Tabela II.3. Apresentação esquemática dos tratamentos utilizados na etapa de maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

Maturação –MIV	Suplementação
Controle	SFB (10%) - (Crypion®)
FE	Fluido embriônico (10%)- (Sigma, E1761)
SS	Substituto do soro (20µl/mL) - (Sigma, S0638)
OVA+ITS	OVA (4mg/mL) – (Inlab®, 1860)+ mistura de ITS*
K	K (10%)

FE = fluido embriônico; SS = substituto de soro; OVA = ovalbumina; K = Knockout

*ITS (8mg de insulina, 8mg de transferrina e 8µg de selênio por mL de meio)

Sigma – cat nºI-1884

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

Oócitos maturados *in vitro* oriundos dos 5 tratamentos com diferentes suplementos protéicos (SFB, FE, SS, OVA+ITS e K), foram fecundados *in vitro* na presença de BSA (Tabela II.4).

A fecundação *in vitro* (FIV) foi realizada após 24h de MIV, em gotas de 100µL de meio TALP-FIV [meio TALP com 30µg/mL de heparina (Sigma H-3149), 18µM de penicilamina (Sigma P 4875), 10µM de hipotaurina (Sigma H-1384) e 1,8µM de epinefrina (Sigma E-4250)], contendo 0,2mM de piruvato de sódio, 83,4µg/mL de antibiótico, amicacina e suplementado com 6mg/mL de BSA, cobertas com óleo mineral.

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

Foram recuperados 30µL do sedimento, que foram avaliados quanto à concentração e motilidade espermática. A concentração final foi ajustada para 25×10^6 espermatozóides móveis/mL com meio TALP-FIV sob óleo mineral. Posteriormente,

8µL do sêmen diluído foram adicionados às gotas contendo de 20 a 25 oócitos, obtendo-se a concentração final de 2×10^5 espermatozóides vivos/gota (2×10^6 /mL), resultando em $8-10 \times 10^3$ de espermatozóides por oócito. O período de co-incubação foi de 18 a 20h, em incubadora à temperatura de 38,5, 5% de CO₂ em ar e umidade saturada.

Tabela II.4. Apresentação esquemática dos tratamentos utilizados nas etapas de maturação e fecundação *in vitro* de oócitos bovinos (Experimento III).

Grupos	Maturação –MIV	Fecundação – FIV
CONT	SFB (10%)	BSA (6mg/mL)
FE	FE (10%)	BSA (6mg/mL)
SS	SS (20µL/mL)	BSA (6mg/mL)
OVA+ITS	OVA (4mg/mL) + mistura de ITS*	BSA (6mg/mL)
K	K (10%)	BSA (6mg/mL)

FE = fluido embriônico; SS = substituto de soro; OVA = ovalbumina; K = Knockout

*ITS (8mg de insulina, 8mg de transferrina e 8µg de selênio por mL de meio).

2.3.3. Cultivo *in vitro* (CIV)

Após o término da incubação com os espermatozóides, os prováveis zigotos foram submetidos ao cultivo de desenvolvimento (CIV) em placas de 4 poços Nunc®, com 500 µL de meio SOF suplementado com 0,5% de BSA e 2,5% de SFB, cobertos com óleo mineral, em, atmosfera com 5% de CO₂ em ar, e umidade saturada, à temperatura de 38,5°C, durante 7 dias, para atingirem o estágio de blastocisto (dia 0 = dia da fecundação). Após 96 horas foi realizado o “feeding” ou troca de meio, retirando-se 50% do meio de cultivo e adicionando-se a mesma quantidade de meio recém-preparado.

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

A taxa de clivagem foi avaliada aproximadamente 32 a 36 horas após a fecundação *in vitro* (hpi), em microscópio estereoscópico (aumento de 50 X) e embriões de duas e quatro células foram considerados clivados.

No sétimo dia após a fecundação *in vitro*, foi avaliada a taxa de desenvolvimento embrionário até os estádios de blastocisto (BI), sendo contabilizados desde blastocisto inicial (Bi) a blastocisto expandido (Bx). A eclosão dos blastocistos foi avaliada no oitavo e nono dias após a FIV.

2.4. Experimento IV: Utilização de diferentes fontes protéicas (SFB, FE, SS, OVA+ITS e K) nas etapas de maturação, e cultivo *in vitro* e sua consequência no desenvolvimento embrionário *in vitro*

Neste experimento, foi avaliada a influência de fontes protéicas alternativas (FE, SS, OVA+ITS e K), nas etapas de MIV e CIV da PIV de embriões, pela análise da taxa de clivagem, taxa de produção de blastocisto, taxa de eclosão, número de células da massa celular interna e trofoblasto, e número total de células dos embriões.

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

A metodologia para obtenção, seleção e maturação *in vitro* dos oócitos bovinos foi desenvolvida como anteriormente, descrita no item 2.3.1.

2.4.2. Fecundação *in vitro* (FIV)

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

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

A metodologia para cultivo *in vitro* foi desenvolvida como descrito anteriormente de acordo com 5.3.3., exceto as suplementações protéicas utilizadas.

Tabela II.5. Apresentação esquemática dos tratamentos utilizados nas etapas de maturação e fecundação *in vitro* de oócitos bovinos (Experimento IV).

Grupos	Maturação –MIV	Cultivo – CIV
CONT	SFB (10%)	SFB (2,5%)+ 0,5% de BSA
FE	FE (10%)	FE (10%)
SS	SS (20µL/mL)	SS (20µL/mL)
OVA+ITS	OVA (4mg/mL) + mistura de ITS*	OVA (4mg/mL) + mistura de ITS*
K	K (10%)	K (10%)

FE = fluido embrionário; SS = substituto de soro; OVA = ovalbumina; K = Knockout

*ITS (8mg de insulina, 8mg de transferrina e 8µg de selênio por mL de meio) Sigma – cat nºI-1884

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

A metodologia para quantificação das taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário e de eclosão dos embriões CIV foi desenvolvida como descrito anteriormente de acordo com o item 5.3.4.

2.5. Experimento V: Avaliação da influência de diferentes fontes protéicas (SFB, FE, SS, OVA+ITS e K) somente na etapa de cultivo *in vitro* e sua consequência no desenvolvimento embrionário *in vitro*

Neste experimento, foi avaliada a influência de fontes protéicas alternativas (FE, SS, OVA+ITS e K), na etapa de CIV, pela análise da taxa de clivagem, taxa de produção de blastocisto, taxa de eclosão, número de células da massa celular interna e trofoblasto, e número total de células dos embriões.

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

A metodologia para obtenção, seleção e maturação *in vitro* dos oócitos bovinos foi desenvolvida como anteriormente, descrita no item 2.3.1.

2.5.2. Fecundação *in vitro* (FIV)

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

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

A metodologia para cultivo *in vitro* foi desenvolvida como descrito anteriormente de acordo com 5.3.3.

2.5.4. Quantificação das taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário

A metodologia para quantificação das taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário foi desenvolvida como descrito anteriormente de acordo com o item 5.3.4.

ETAPAS PIV

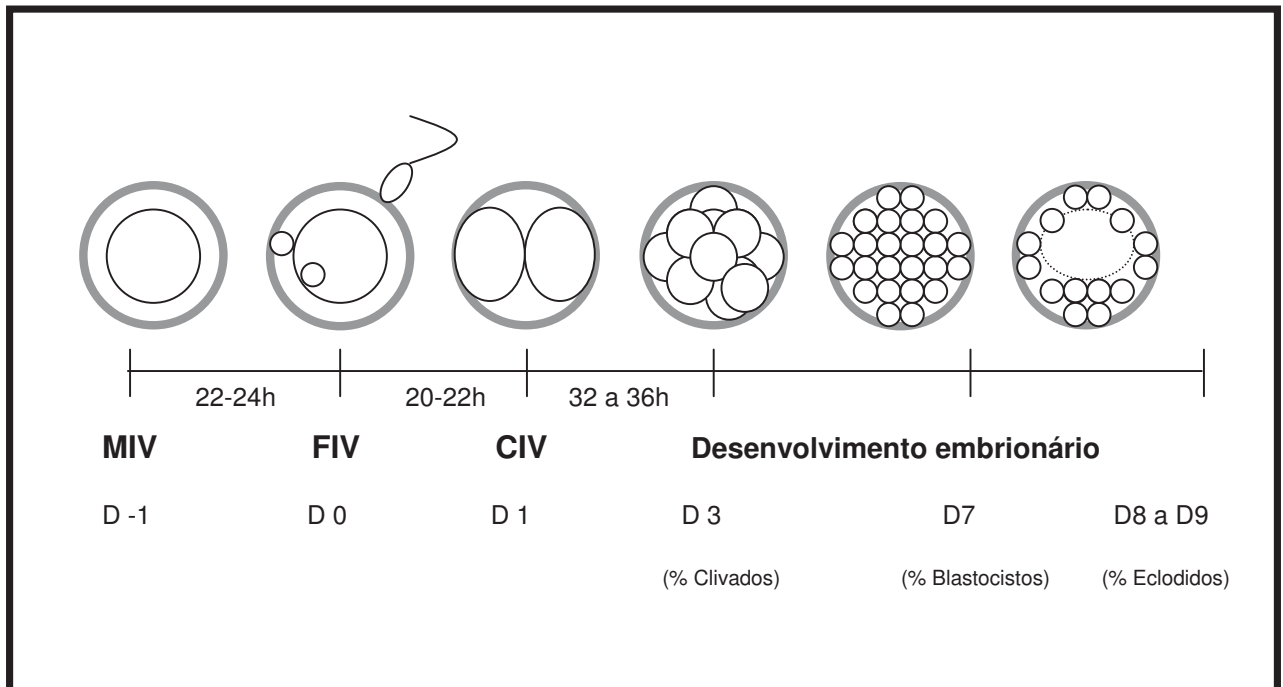


Figura II.1. Modelo esquemático da PIV. A PIV foi realizada mediante maturação (MIV) durante 24 horas, fecundação (FIV) e cultivo (CIV) de 18 a 20 horas pós-inseminação (hpi). Decorridas 32 a 36 hpi foi realizada a contagem da taxa de clivagem, no D7 foi verificada a taxa de produção de blastocistos e no D8 e D9, avaliada a taxa de eclosão, com intuito de verificar os efeitos causados pelas diferentes fontes protéicas nas três etapas da PIV.

2.6. Experimento VI: Verificação da qualidade embrionária através do número de células da MCI, do TF, e total nos embriões CIV

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

2.6.1. Determinação do número de células da massa celular interna (MCI) e trofoblasto (TF)

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

Os blastocistos obtidos no dia 7 após a fecundação foram tratados com pronase (0,5% em PBS) por 3 min e em seguida, por solução "Tyrodes Ácida" (pH 2,1) a 37°C por 40 seg, para retirada da zona pelúcida. Posteriormente, os blastocistos foram lavados três vezes em meio TCM-199 Hepes com 10% de SFB e duas vezes em meio TCM-199 Hepes sem SFB. Os blastocistos foram incubados em gelo durante 10 minutos, em solução de ácido pícrico (10 mM; Reagen®) e PVP (3mg/mL; Sigma®) em PBS. Após lavagem em meio TCM-199 Hepes, foram incubados a 38,5°C por 30 minutos com soro de coelho anti-bovino na proporção de 1:10 em meio TCM-199 Bicarbonato. Após nova lavagem em meio TCM-199 com 10% de SFB, os embriões foram incubados a 38,5°C por mais 30 minutos em complemento de cobaia na proporção de 1:10 em meio TCM-199 Hepes acrescido de 10 µg/mL de iodeto de propídio (Sigma® – P-4170) (corante não vital) e 10µg/mL de Hoechst 33342 (corante vital). Para finalização, foram lavados em PBS com 0,3% de BSA e fixados entre lâminas e lamínulas com glicerol, onde foram levemente achatados por pressão manual.

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

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

2.7. Experimento VII: Verificação da apoptose através de Coloração “Terminal Transferase Assay” – TUNEL

Foi utilizada a técnica de TUNEL – “In situ terminal deoxinucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay”.

Após 7 dias de CIV, os embriões (estádio de mórula, blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido) foram selecionados para serem avaliados em porcentagem de células em apoptose, utilizando a técnica de coloração “*In situ terminal deoxinucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay*” (TUNEL) descrita por Paula-Lopes e Hansen (2002).

Os embriões foram lavados em 100µL de PBS com PVP (1mg/mL) e fixados, com a zona pelúcida intacta, em 100 µL de solução de paraformaldeído (4% em PBS, pH 7,4) a temperatura ambiente, por 1h, os quais foram novamente lavados em 100 µL de PBS-PVP e armazenados sob refrigeração (4 °C), para posterior processamento.

O processamento ocorreu pela permeabilização dos embriões em 200 µL de solução de Triton X-100 (0,5%, v/v) em citrato de sódio (0,1%), por 30 min em temperatura ambiente, sendo em seguida, incubados os embriões reservados para controle positivo com DNase I (50 UI/mL de água Milli-Q) (RNase free) a 37°C por 1h, enquanto os embriões dos tratamentos ficaram em gotas de 100 µL de PBS-PVP.

Todos os embriões foram lavados em 100 µL de PBS-PVP e incubados, em câmara úmida, com 15 µL da mistura (1:9, da enzima – tubo 1 e do tampão da enzima – tubo 2, respectivamente) para a coloração TUNEL (“*In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein*”, Roche Diagnostics, Germany), por 1h a 37°C na ausência de luz, acondicionados em recipiente plástico.

Os embriões reservados para o controle negativo foram incubados na ausência da enzima *terminal deoxinucleotidyl transferase* (TdT). Os embriões de todos os grupos experimentais foram incubados em 100 µL de RNase A (50 µg/mL de água Milli-Q) por 1h em temperatura ambiente, seguida por incubação com Hoechst 33342 (0,5 µg/mL de PBS-PVP) por 30 min. em temperatura ambiente. Em seguida os embriões foram

lavados em PBS-PVP e colocados entre lâmina e lamínula com glicerina tamponada (9:1).

Os embriões foram então avaliados em microscópio de epifluorescência (excitação de 510-550 nm e emissão de 590 nm) quanto ao número de células com fragmentação de DNA (TUNEL positivas – fluorescência verde ou amarela pontual dentro do núcleo) localizadas na MCI e no TF em relação ao número total de células do blastocisto, determinado pelos núcleos corados em azul pelo Hoechst 33342.

2.8. Experimento VIII: Avaliação da influência de diferentes fontes protéicas (SFB, FE, SS, OVA+ITS e K) na criopreservação de embriões bovinos

2.8.1. Congelação dos Embriões

No 8º dia de desenvolvimento, os embriões foram congelados. Para isso, foram lavados uma vez em PBS + 4mg/ml BSA e transferidos para PBS + Etileno (1.4M), onde permaneceram no máximo por 10 minutos. Foram envasados em palhetas de 0,25mL, e as mesmas foram, em seguida, colocadas no aparelho de congelação (BIOCOM), sendo utilizada uma curva de congelação de -6 a - 35°C. Ao término do processo, as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido, introduzidas nas raques e colocadas no botijão de nitrogênio líquido (-196 °C).

2.8.2. Descongelação dos embriões

Os embriões criopreservados foram descongelados por 8 segundos em ar e 12 segundos em água a 35°C. Então foram colocados em meio contendo sacarose 0,25M por 1 minuto. Posteriormente foram transferidos para sacarose 0,15M, onde permaneceram por 4 min para reidratação. Os embriões foram lavados 2 vezes em meio de lavagem (Apêndice I) suplementado com SFB, 0,20mM de piruvato e 83,4µg/mL de amicacina, por 3 min e transferidos para gotas de meio SOF

mergulhadas em óleo mineral. Após 24 e 48 horas, avaliou-se o número de blastocistos eclodidos.

2.8.3. Quantificação das taxas de eclosão dos embriões CIV

A metodologia para quantificação das taxas de eclosão dos embriões CIV foi desenvolvida como descrito anteriormente de acordo com o item 5.3.4.

2.9. Análise estatística

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

Os resultados dos experimentos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey. Foi utilizado um nível de significância de 5% em todos os experimentos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Experimento I: Influência da concentração de fluido embriônico (FE), substituto de soro (SS), conalbumina (C), e albumina fração VII (A) na maturação nuclear e na migração de grânulos corticais em oócitos bovinos

3.1.1. Avaliação da maturação oocitária (maturação nuclear)

Os oócitos foram classificados quanto à maturação nuclear pelo estágio de progressão meiótica, e foram considerados maduros quando no estágio de MII.

Para se determinar a melhor concentração de cada fonte protéica testada na etapa de maturação *in vitro* de oócitos bovinos, foram utilizados 2603 oócitos, distribuídos nos quatro grupos experimentais em três repetições (206-225 oócitos por tratamento). No total dos oócitos avaliados, 1530 oócitos (58,78%) atingiram o estágio de metáfase II, e 1147 oócitos (44,06%) apresentaram grânulos corticais (GC) dispostos na periferia da membrana citoplasmática.

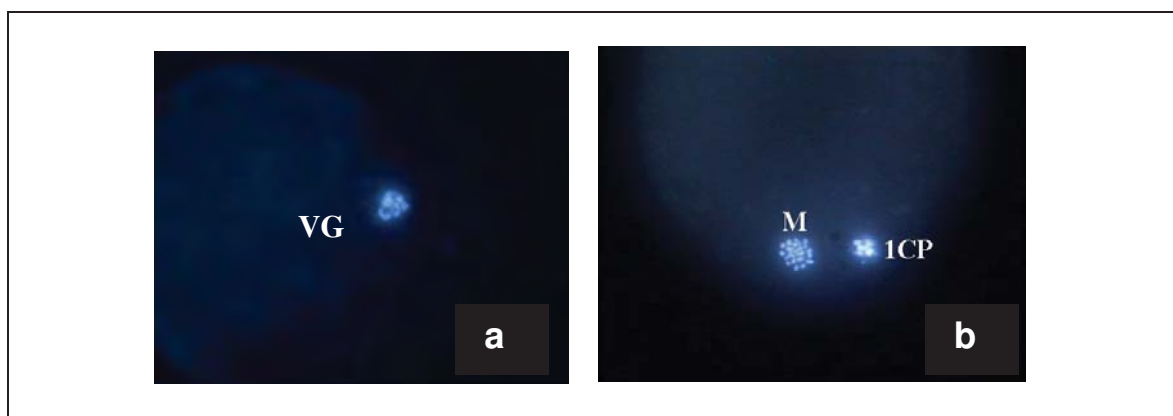


Figura II.2. Aspecto morfológico da progressão nuclear em oócitos bovinos MIV por 24 h, corados com Hoechst 33342 e avaliados sob microscopia de epifluorescência. (a) Oócito imaturo, apresentando vesícula germinativa (VG); (b) Oócito maduro, apresentando metáfase II (M), com presença do primeiro corpúsculo polar (1CP).

Tabela II.6. Valores médios (% $\pm$ dp) de maturação nuclear (oócitos em metáfase II) após cultivo de maturação por 24 h, em meios suplementados com 5, 10 ou 15% de fluido embriônico (FE).

Grupos	Nº de oócitos	Maturação nuclear (médias % $\pm$ dp)
5%	215	66,31 $\pm$ 2,32 ^a
10%	217	81,98 $\pm$ 1,31 ^b
15%	219	75,62 $\pm$ 1,10 ^c

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

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

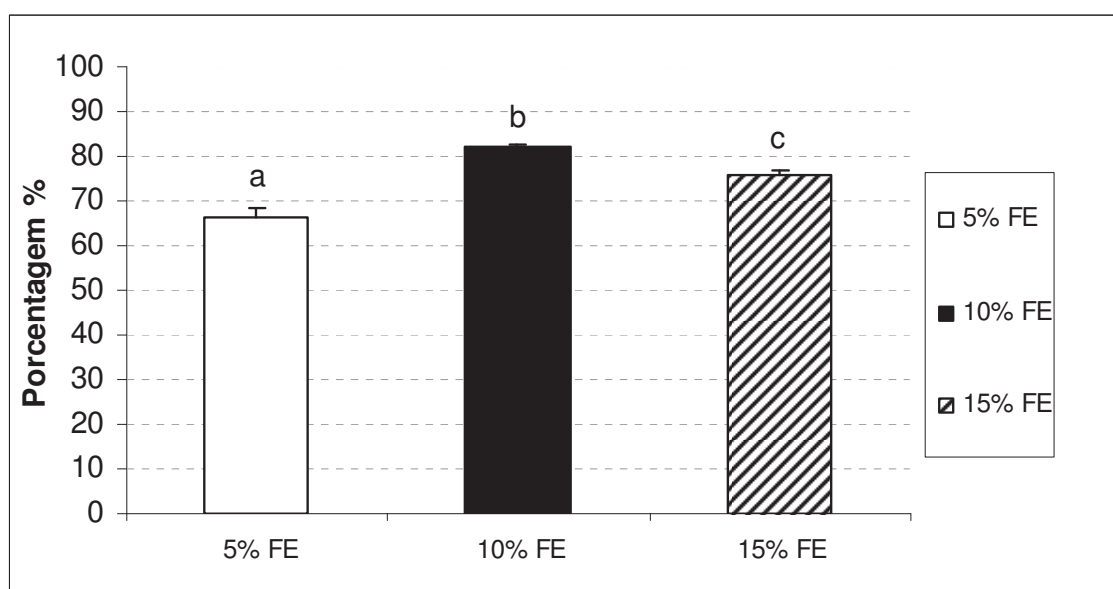


Figura II.3. Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de oócitos em metáfase II, após 24 h de maturação *in vitro*, em meios suplementados com 5, 10 e 15% de FE. ^{a,b,c}Colunas com sobrescritos diferentes, diferem entre si ($P < 0,05$).

A concentração de 10% (FE) foi superior ($p < 0,05$) quanto à maturação nuclear quando comparada às concentrações de 5 e 15% de FE.

Tabela II.7. Valores médios ($\% \pm dp$) de maturação nuclear (oócitos em metáfase II) após cultivo de maturação por 24 h, em meios suplementados com 20, 40 ou 60 $\mu\text{L/mL}$ de substituto de soro (SS).

Grupos	Nº de oócitos	Maturação nuclear (médias $\% \pm dp$)
20 $\mu\text{L/mL}$	206	$77,54 \pm 1,69^a$
40 $\mu\text{L/mL}$	210	$75,74 \pm 1,26^a$
60 $\mu\text{L/mL}$	212	$66,26 \pm 1,78^b$

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

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

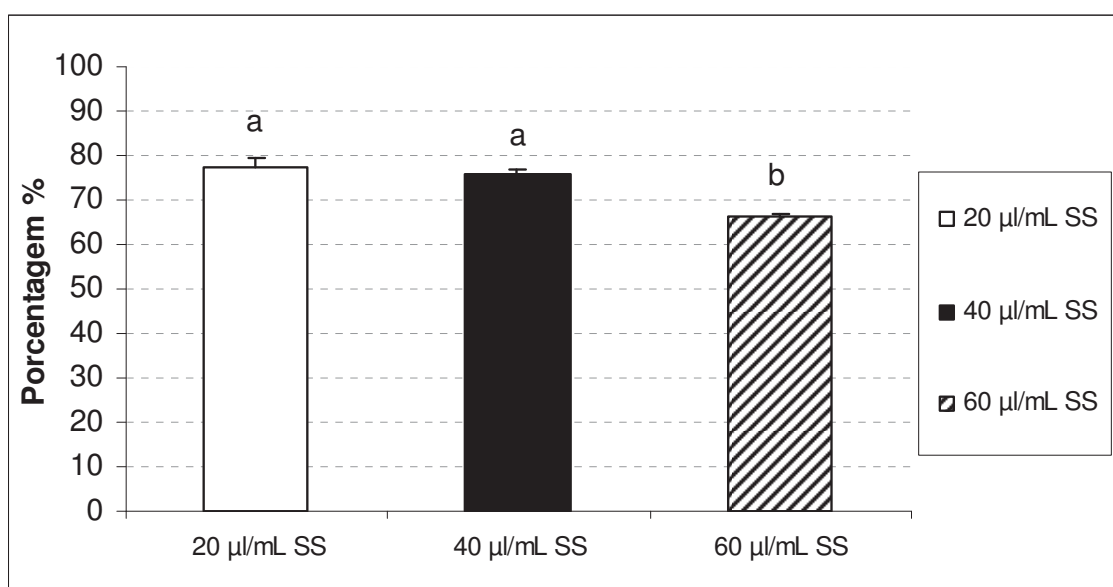


Figura II.4. Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de oócitos em metáfase II, após 24 h de maturação *in vitro*, em meios suplementados com 20, 40 e 60 $\mu\text{L/mL}$ de SS. ^{a,b,c}Colunas com sobrescritos diferentes, diferem entre si ($P < 0,05$).

As concentrações de 20 e 40 $\mu\text{L/mL}$ (SS) ($p > 0,05$) não diferiram estatisticamente, porém foram superiores ($p < 0,05$) quanto à maturação nuclear quando comparadas à concentração de 60 $\mu\text{L/mL}$ (SS).

Tabela II.8. Valores médios (% $\pm$ dp) de maturação nuclear (oócitos em metáfase II) após cultivo de maturação por 24 h, em meios suplementados com 2, 4 ou 6 mg/mL de conalbumina (C).

Grupos	Nº de oócitos	Maturação nuclear (médias % $\pm$ dp)
2 mg/mL	223	36,89 $\pm$ 2,06 ^a
4 mg/mL	225	37,81 $\pm$ 0,48 ^a
6 mg/mL	214	28,45 $\pm$ 1,38 ^b

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

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

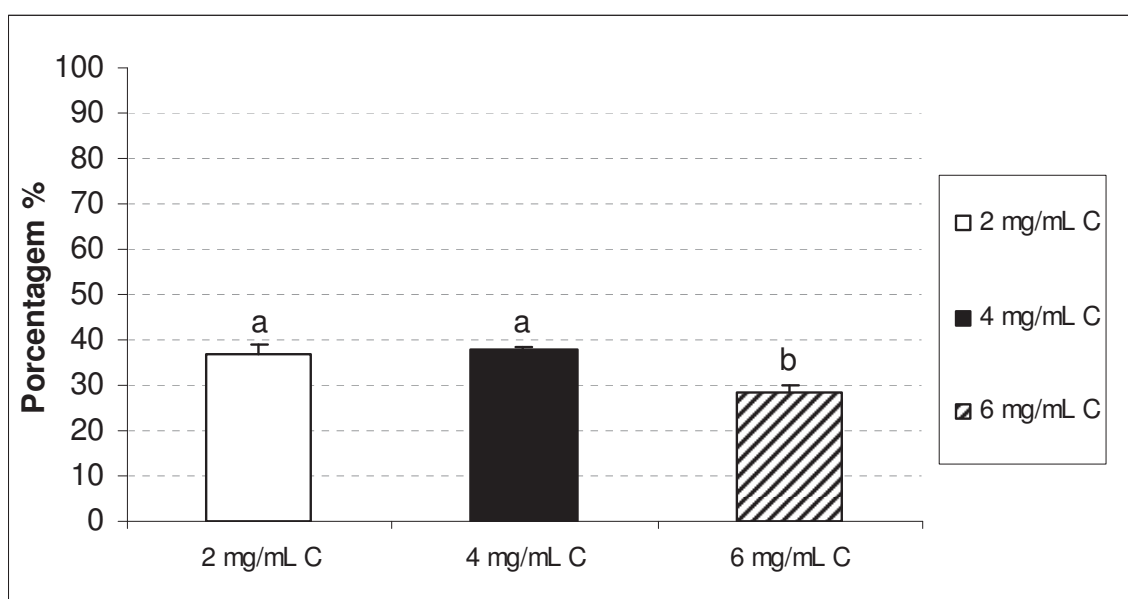


Figura II.5. Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de oócitos em metáfase II, após 24 h de maturação *in vitro*, em meios suplementados com 2, 4 e 6 mg/mL de C. ^{a,b,c}Colunas com sobrescritos diferentes, diferem entre si ($P < 0,05$).

As concentrações de 2 e 4mg/mL (C) ($p > 0,05$) não diferiram estatisticamente, porém foram superiores ($p < 0,05$) quanto à maturação nuclear quando comparada à concentração de 6 mg/mL (C).

Tabela II.9. Valores médios (% $\pm$ dp) de maturação nuclear (oócitos em metáfase II) após cultivo de maturação por 24 h, em meios suplementados com 2, 4 ou 6 mg/mL de albumina fração VII (A).

Grupos	Nº de oócitos	Maturação nuclear (médias % $\pm$ dp)
2 mg/mL	221	59,02 $\pm$ 3,00 ^a
4 mg/mL	218	58,96 $\pm$ 2,48 ^a
6 mg/mL	223	54,17 $\pm$ 1,19 ^a

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

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

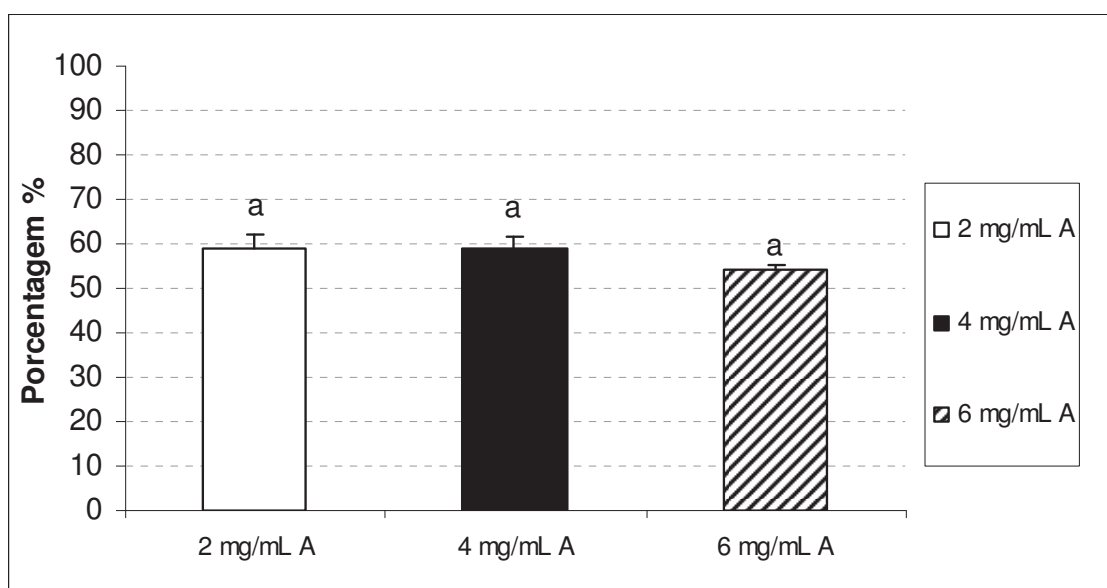


Figura II.6. Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de oócitos em metáfase II, após 24 h de maturação *in vitro*, em meios suplementados com 2, 4 e 6 mg/mL de A.

As concentrações de 2, 4 e 6 mg/mL (A) ($p > 0,05$) não diferiram estatisticamente entre si.

3.1.2. Avaliação da maturação oocitária (maturação citoplasmática)

A migração dos grânulos corticais (GC) para a periferia dos oócitos é utilizada como índice de maturação citoplasmática, pois representa uma das alterações que ocorrem com as organelas na etapa de maturação oocitária, dentre várias outras modificações, e foi utilizada como parâmetro para avaliar a maturação citoplasmática dos oócitos.

A maturação citoplasmática não é garantida pela maturação nuclear, já que as condições de cultivo podem influenciar diretamente a MIV dos oócitos de forma diferente.

Os oócitos foram classificados de acordo com a distribuição dos GC, sendo considerados imaturos aqueles com GC dispostos em “clusters” distribuídos por todo o citoplasma, e os oócitos com GC migrando para a periferia; e maduros os oócitos com GC dispostos na periferia de forma homogênea.

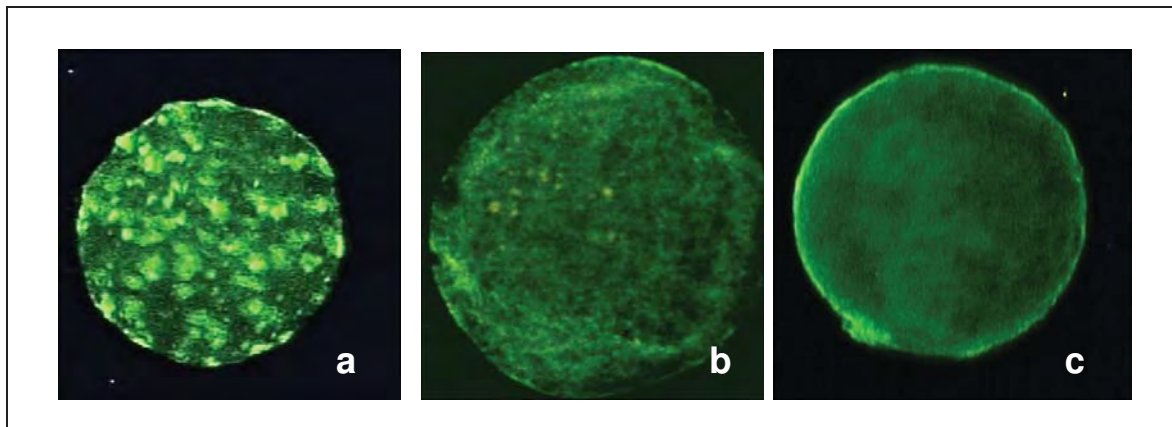


Figura II.7. Aspecto morfológico da distribuição dos grânulos corticais em oócitos bovinos MIV por 24h, corados com lecitina (específica a α -D-manose) conjugada a isotiocianato conjugado a fluoresceína (FITC), e avaliados sob microscopia de epifluorescência. (a) Oócito apresentando GC dispostos em “clusters”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

Tabela II.10. Valores médios (% $\pm$ dp) de oócitos bovinos apresentando GC periféricos, como índice de maturação citoplasmática, após cultivo de maturação por 24 h, em meios suplementados com 5, 10 ou 15% de fluido embriônico (FE).

Grupos	Nº de oócitos	Maturação citoplasmática (médias % $\pm$ dp)
5%	215	41,22 $\pm$ 1,52 ^a
10%	217	70,95 $\pm$ 2,32 ^b
15%	219	59,51 $\pm$ 4,20 ^c

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

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

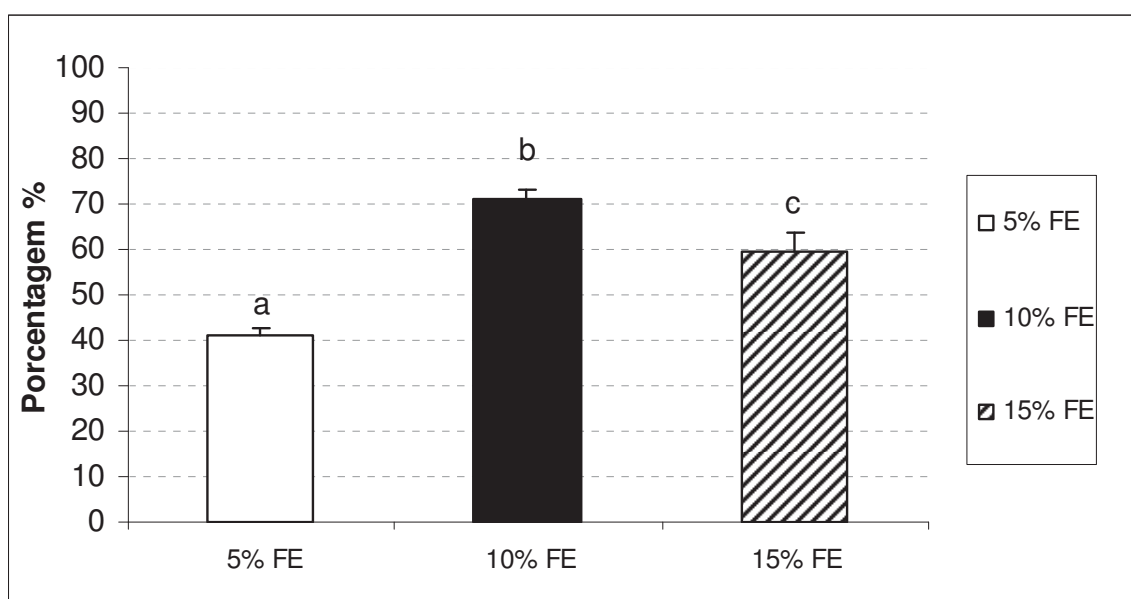


Figura II.8. Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de oócitos com grânulos corticais na periferia, como índice de maturação citoplasmática, após 24h de maturação *in vitro*, em meios suplementados com 5, 10 e 15% de FE. ^{a,b,c}Colunas com sobrescritos diferentes, diferem entre si ($P < 0,05$)

A concentração de 10% (FE) foi superior ($p < 0,05$) quanto à maturação citoplasmática quando comparada às concentrações de 5 e 15% de FE.

Tabela II.11. Valores médios (% $\pm$ dp) de oócitos bovinos apresentando GC periféricos, como índice de maturação citoplasmática, após cultivo de maturação por 24 h, em meios suplementados com 20, 40 ou 60 μ L/mL de substituto de soro (SS).

Grupos	Nº de oócitos	Maturação citoplasmática (médias % $\pm$ dp)
20 μ L/mL	206	70,05 $\pm$ 3,62 ^a
40 μ L/mL	210	69,35 $\pm$ 3,64 ^a
60 μ L/mL	212	54,66 $\pm$ 2,81 ^b

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

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

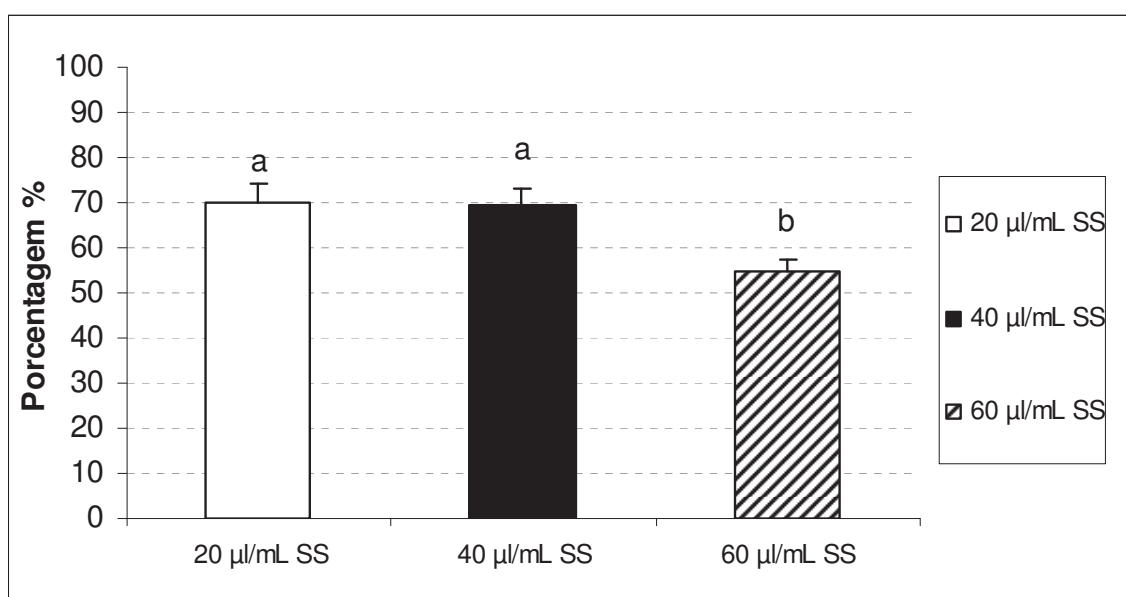


Figura II.9. Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de oócitos com grânulos corticais na periferia, como índice de maturação citoplasmática, após 24h de maturação *in vitro*, em meios suplementados com 20, 40 e 60 μ L/mL de SS. ^{a,b}Colunas com sobrescritos diferentes, diferem entre si ($P < 0,05$).

As concentrações de 20 e 40 μ L/mL (SS) ($p > 0,05$) não diferiram estatisticamente, porém foram superiores ($p < 0,05$) quando comparadas à concentração de 60 μ L/mL (SS).

Tabela II.12. Valores médios (% $\pm$ dp) de oócitos bovinos apresentando GC periféricos, como índice de maturação citoplasmática, após cultivo de maturação por 24 h, em meios suplementados com 2, 4 ou 6 mg/mL de conalbumina (C).

Grupos	Nº de oócitos	Maturação citoplasmática (médias % $\pm$ dp)
2 mg/mL	223	28,23 $\pm$ 2,96 ^a
4 mg/mL	225	28,49 $\pm$ 2,62 ^a
6 mg/mL	214	21,87 $\pm$ 1,17 ^b

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

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

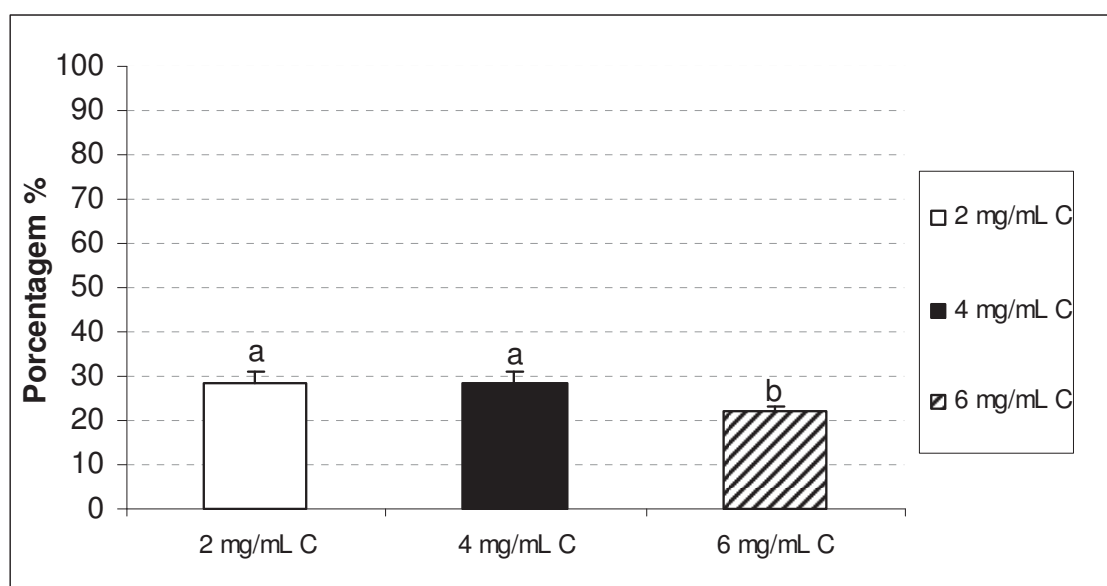


Figura II.10. Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de oócitos com grânulos corticais na periferia, como índice de maturação citoplasmática, após 24h de maturação *in vitro*, em meios suplementados com 2, 4 e 6 mg/mL de C. ^{a,b}Colunas com sobrescritos diferentes, diferem entre si ($P < 0,05$).

As concentrações de 2 e 4mg/mL (C) ($p > 0,05$) não diferiram estatisticamente, porém foram superiores ($p < 0,05$) quando comparadas à concentração de 6 mg/mL (C).

Tabela II.13. Valores médios (% $\pm$ dp) de oócitos bovinos apresentando GC periféricos, como índice de maturação citoplasmática, após cultivo de maturação por 24 h, em meios suplementados com 2, 4 ou 6 mg/mL de albumina fração VII (A).

Grupos	Nº de oócitos	Maturação citoplasmática (médias % $\pm$ dp)
2 mg/mL	221	29,77 $\pm$ 1,05 ^{ab}
4 mg/mL	218	33,74 $\pm$ 2,52 ^a
6 mg/mL	223	24,63 $\pm$ 2,63 ^b

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

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

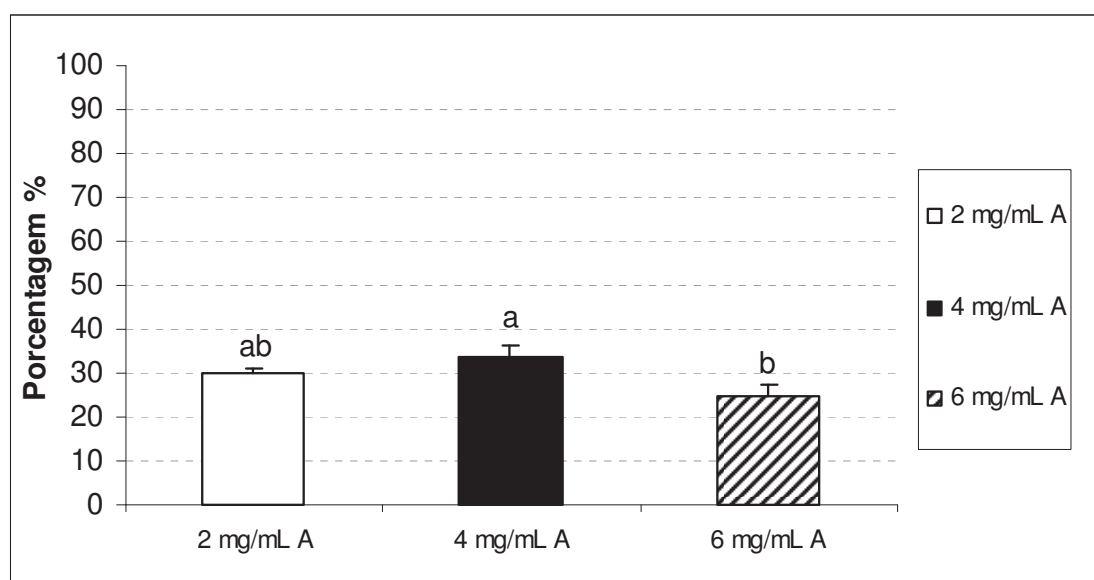


Figura II.11. Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de oócitos com grânulos corticais na periferia, como índice de maturação citoplasmática, após 24h de maturação *in vitro*, em meios suplementados com 2, 4 e 6 mg/mL de A. ^{a,b}Colunas com sobrescritos diferentes, diferem entre si ($P < 0,05$).

A concentração de 2 mg/mL (A) ($p > 0,05$) não diferiu estatisticamente das concentrações 4 e 6 mg/mL (A) ($p > 0,05$). Porém a concentração de 4 mg/mL (A) ($p < 0,05$) foi superior a concentração de 6 mg/mL (A).

Como as fontes protéicas conalbumina (C) e albumina fração VII (A) promoveram baixas taxas de maturação nuclear (37,81 e 59,02%, respectivamente) e baixas taxas de maturação citoplasmática, migração de grânulos corticais (28,49 e 33,74%, respectivamente), as mesmas não foram utilizadas nos experimentos seguintes.

Somente as fontes que apresentaram melhores resultados nesse experimento, que foram o fluido embriônico (FE) e o substituto de soro (SS), ao promoverem maiores taxas de maturação nuclear (81,98 e 77,54%, respectivamente), e de migração dos grânulos corticais para a periferia (70,95 e 70,05%, respectivamente), foram utilizadas nos demais experimentos envolvendo as etapas de fecundação e cultivo *in vitro*.

Constatou-se, de fato, ação prejudicial da conalbumina e albumina fração VII quando adicionadas ao meio de maturação, pois as mesmas promoveram baixas taxas de maturação nuclear e migração dos grânulos corticais.

A MIV é uma etapa importante na produção *in vitro* de embriões bovinos, pois os oócitos maduros, depois de fecundados, devem sustentar o desenvolvimento embrionário e fetal, resultando em indivíduos saudáveis (DIELEMAN *et al.*, 2002; VANHOUTTE *et al.*, 2007).

A maturação *in vitro* (MIV) é uma técnica reprodutiva que permite que os oócitos atinjam a metáfase II e adquiram a competência para serem fecundados e, assim, iniciem a embriogênese (SMITZ *et al.*, 2004).

Atualmente, evidências disponíveis indicam que as condições de cultivo adequadas suportam a maturação nuclear, mas frequentemente não conseguem sustentar a maturação citoplasmática (COMBELLES *et al.*, 2002). A natureza desta deficiência ainda está sujeita à especulação (VANHOUTTE *et al.*, 2007).

3.2. Experimento II: Avaliação da influência do SFB, FE e SS como suplementos protéicos na maturação *in vitro* de oócitos bovinos

Para se determinar a melhor fonte protéica durante a etapa de maturação *in vitro* de oócitos bovinos, foram utilizados 651 oócitos, distribuídos nos três grupos experimentais em três repetições (215-219 oócitos por tratamento). No total dos oócitos avaliados, 527 oócitos (80,95%) atingiram o estágio de metáfase II e 465 oócitos (71,42%) apresentaram GC dispostos na periferia da membrana citoplasmática.

As taxas de maturação nuclear para os diferentes tratamentos estão descritas na Tabela II.14 e demonstradas nas Figuras II.12. Observamos que o grupo tratado com 10% de FE (81,98%) foi semelhante ($p>0,05$) ao grupo controle suplementado com 10% SFB (85,74%). Por outro lado, a taxa de maturação nuclear no grupo tratado com 20 $\mu\text{L/mL}$ de SS (77,54%) foi inferior ($p<0,05$) ao grupo controle.

Tabela II.14. Valores médios ($\% \pm \text{dp}$) de maturação nuclear (oócitos em metáfase II) após cultivo de maturação por 24 h, em meios suplementados com 10%SFB (Controle), 10% FE e 20 $\mu\text{L/mL}$ de SS.

Grupos	Nº de oócitos	Maturação nuclear (médias $\% \pm \text{dp}$)
Cont	215	83,74 $\pm$ 2,76 ^a
FE	217	81,98 $\pm$ 1,31 ^{ab}
SS	219	77,54 $\pm$ 1,68 ^b

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

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

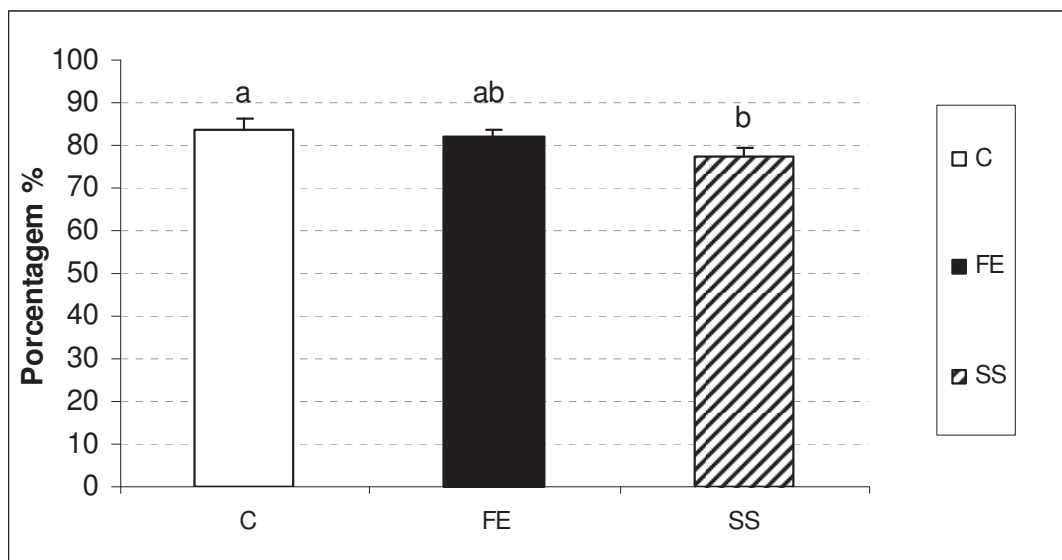


Figura II.12. Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de oócitos em metáfase II, após 24 h de maturação *in vitro*, em meios suplementados com 10%SFB (C), 10% FE e 20µL/ml SS. ^{a,b}Colunas com sobrescritos diferentes, diferem entre si (P<0,05)

As taxas de maturação citoplasmática para os diferentes tratamentos estão descritas na Tabela II.15 e demonstradas nas Figuras II.13. É possível observar que o grupo controle (73,35%) foi semelhante estatisticamente ($p>0,05$) aos grupos tratados com 10% FE (70,95%), e 20 µL/mL de SS (70,03%).

Tabela II.15. Valores médios (% ± dp) de oócitos bovinos apresentando GC periféricos, como índice de maturação citoplasmática, após cultivo de maturação por 24 h, em meios suplementados com 10%SFB (Controle), 10% FE e 20 µL/mL de SS.

Grupos	Nº de oócitos	Maturação citoplasmática (médias % ± dp)
Cont	215	73,35 ± 0,98 ^a
FE	217	70,95 ± 2,32 ^a
SS	219	70,03 ± 2,92 ^a

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

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

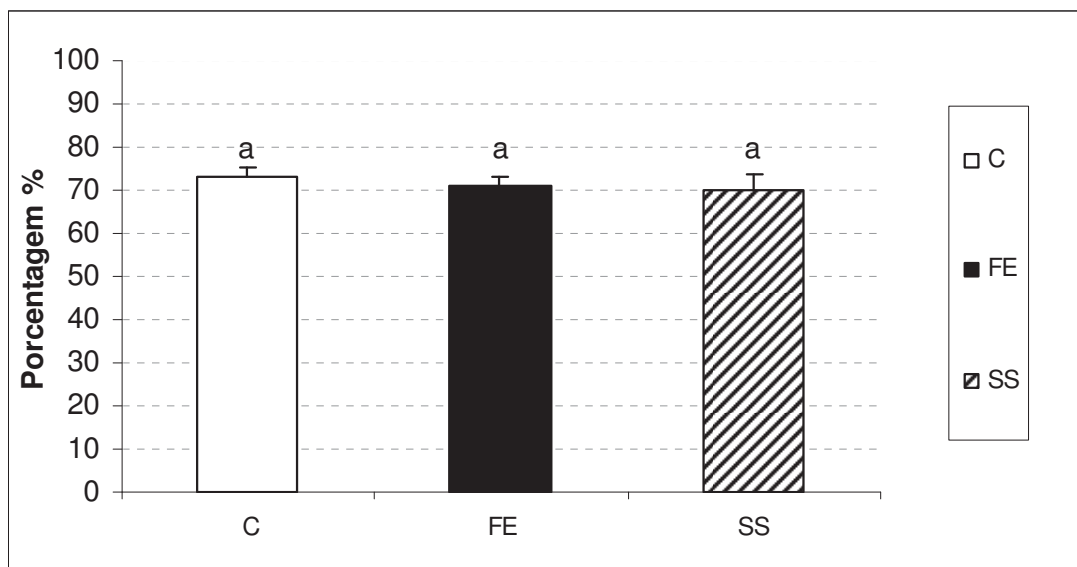


Figura II.13. Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de oócitos com grânulos corticais na periferia, como índice de maturação citoplasmática, após 24h de maturação *in vitro*, em meios suplementados com 10% SFB (C), 10% FE e 20µL/ml SS.

A partir dos resultados de maturação nuclear, constatamos que não houve diferença significativa entre os grupos controle e FE, o grupo tratado com 10% de FE (81,98%) foi semelhante ($p > 0,05$) ao grupo controle suplementado com 10% SFB (85,74%). Por outro lado, a taxa de maturação nuclear no grupo tratado com 20 µL/mL de SS (77,54%) foi inferior ($p < 0,05$) ao grupo controle.

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

A maturação nuclear de oócitos pré-ovulatórios é regulada por inúmeros fatores presentes no fluido folicular, pela interação dos oócitos com as células foliculares, bem como por fatores endócrinos, tais como as gonadotrofinas (KIM *et al.*, 2008).

Oócitos provenientes de folículos pré-antrais e antrais iniciais adquirem capacidade de quebra da vesícula germinativa apenas quando atingem um determinado diâmetro de acordo com a espécie, maior que 75 μm para camundongos e maior que 110 μm para ruminantes (EPPIG e SCHROEDER, 1989; FAIR *et al.*, 1995; ANGUITA *et al.*, 2007).

Em bovinos, oócitos de 115 μm de diâmetro podem alcançar o estágio de quebra de vesícula germinativa, mas, para adquirir capacidade de desenvolvimento embrionário, devem estar com diâmetro superior a 120 μm (PAVLOK *et al.*, 1992).

Apesar de observarmos superioridade na maturação nuclear dos grupos controle e FE, quando avaliamos a migração dos grânulos corticais para a periferia do oócito, como indício de maturação citoplasmática, constatamos que não houve diferença significativa entre os grupos.

A maturação citoplasmática pode ser considerada como o conjunto de processos pelo qual o oócito de mamíferos passa para se tornar uma célula capaz de fecundar e dar suporte ao desenvolvimento embrionário inicial. Estas mudanças dizem respeito à redistribuição das organelas celulares, dentre elas os grânulos corticais, a estocagem de proteínas e RNA, o desenvolvimento de mecanismos regulatórios do cálcio, entre outros (ANGUITA *et al.*, 2007). No entanto, os mecanismos celulares envolvidos na competência do oócito ainda não são bem descritos.

A maturação citoplasmática é necessária para a obtenção de condições de bloqueio da polispermia, para descondensar o núcleo do espermatozóide que penetrou no oócito e formar o pró-núcleo masculino após a fecundação. Inclui ainda a redistribuição das organelas celulares, com a migração das mitocôndrias para a posição perinuclear e o acúmulo de grânulos na extensão do oolema (PICTON *et al.*, 1998), desenvolvimento do estoque de lipídeos, redução do complexo de Golgi, redistribuição de ribossomos, rearranjo das mitocôndrias, e alinhamento dos grânulos corticais próximo à membrana plasmática (HYTTEL *et al.*, 1997).

Em oócitos maturados *in vivo* ou *in vitro* os grânulos corticais são encontrados em sua maioria na região do córtex celular (CONNORS *et al.*, 1998; WESSEL *et al.*, 2001; VELILLA *et al.*, 2004), sendo um dos indicativos de maturação citoplasmática.

As transformações estruturais são acompanhadas por uma série de atividades bioquímicas estabelecidas por uma complexa cascata de fosforilações e desfosforilações de proteínas envolvidas no reinício e na regulação da meiose (DE SOUSA *et al.*, 2004; DEKEL, 1998; DUMONT *et al.*, 2005). Entre as proteínas que mais se destacam no período da maturação, estão as proteínas do complexo MPF (fator promotor da maturação) e da família MAPK (proteína cinase ativada por mitógenos). Dessa forma, vários fatores atuam de maneira a tornar o oócito imaturo hábil à fecundação e ao desenvolvimento de um embrião viável.

Durante a maturação citoplasmática, um aumento pronunciado na atividade das cinases inicia uma complexa cascata de fosforilação e desfosforilação de proteína específica. As cinases dependentes de ciclinas (DCKs) são uma família de serina/treonina cinases envolvidas na regulação do ciclo celular (CDK1, 2, 3, 4, 6 e 7), na transcrição (CDK7, 8 e 9) ou na função neuronal (CDK5; SCHANG, 2004; MAPELLI *et al.*, 2005). A atividade da CDK é dependente da interação com uma ciclina, cujos níveis são regulados sequencialmente para assegurar que as fases do ciclo celular prossigam na ordem correta (ARRIS *et al.*, 2000). Exemplos importantes de cinases são o fator promotor de maturação (MPF) e a família da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK; MOTLIK *et al.*, 1998). Os oócitos em crescimento desenvolvem primeiramente a habilidade de ativar o MPF e, posteriormente, de ativar a via MAPK. Somente os oócitos com o crescimento completo possuem competência para ativar efetivamente as duas vias do ciclo celular

Assim, a etapa de MIV tem o potencial de resgatar uma grande quantidade de oócitos imaturos ainda no ovário e cultivá-los *in vitro* até a maturação (GILCHRIST *et al.*, 2008). No entanto, os oócitos maturados *in vitro* não têm o mesmo potencial de desenvolvimento que os oócitos maturados *in vivo* (CHIAN *et al.*, 2004).

Um oócito que não completou ainda sua maturação nuclear e citoplasmática possui baixa qualidade e é incapaz de se desenvolver normalmente (KRISHER, 2004).

No presente experimento, a maturação nuclear, nos diferentes grupos variou de 77,54 a 83,74%, e foi semelhante à obtida por diversos outros autores, de aproximadamente 80% em meios com diferentes fontes protéicas (KIM *et al.*, 1997; MÉO NICIURA, 2005). Assim, como os resultados de migração dos grânulos corticais variaram de 70,03 a 73,35% (oócitos com GC periféricos), e foram semelhantes aos descritos por Méo Niciura (2005), de 67,2 a 79,3%, podemos afirmar que nessas condições de cultivo, as fontes protéicas SFB e FE não afetaram a maturação *in vitro* de oócitos bovinos, e a fonte SS promoveu redução da maturação nuclear.

3.3. Experimento III: Avaliação da influência de diferentes fontes protéicas (SFB, FE, SS, OVA+ITS e K) na maturação *in vitro* e sua consequência no desenvolvimento embrionário

Para avaliação quantitativa, foram utilizados 1453 oócitos bovinos distribuídos em cinco grupos experimentais: CONT, FE, SS, OVA+ITS, K, em cinco repetições. No total dos oócitos avaliados, 1187 (81,69%) clivaram, 561 (38,61% do total de oócitos ou 47,26% do total de clivados) tornaram-se blastocistos e 229 (15,76% do total de oócitos, ou 19,29% do total de clivados, ou 40,82% do total de blastocistos) eclodiram.

As taxas de clivagem, produção de blastocistos e eclosão para os diferentes tratamentos (cinco grupos experimentais) estão demonstradas nas Figuras II.14, II.15 e II.16.

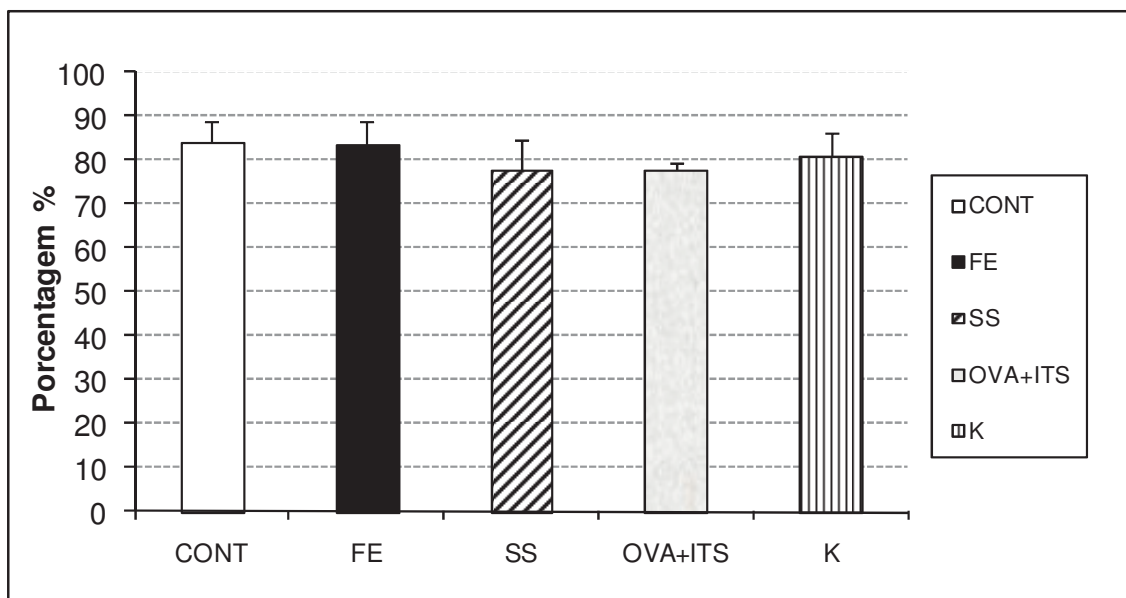


Figura II.14. Representação gráfica da quantificação das taxas de clivagem sob diferentes suplementos protéicos na etapa de MIV.

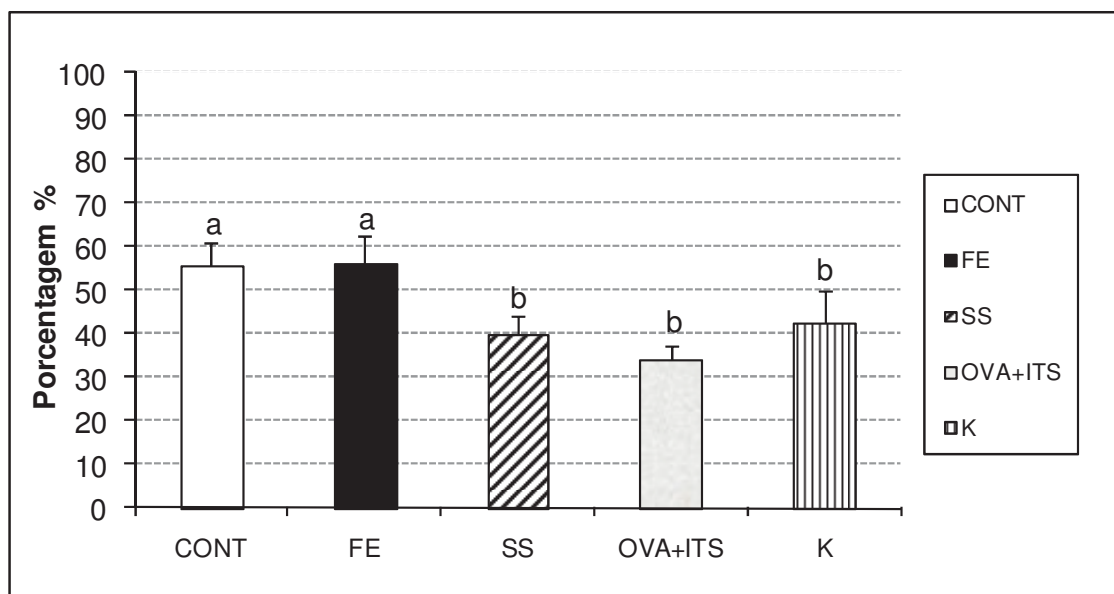


Figura II.15. Representação gráfica da quantificação das taxas de produção de blastocistos sob diferentes suplementos protéicos na etapa de MIV. ^{a,b}Colunas com sobrescritos diferentes, diferem entre si ($P < 0,05$).

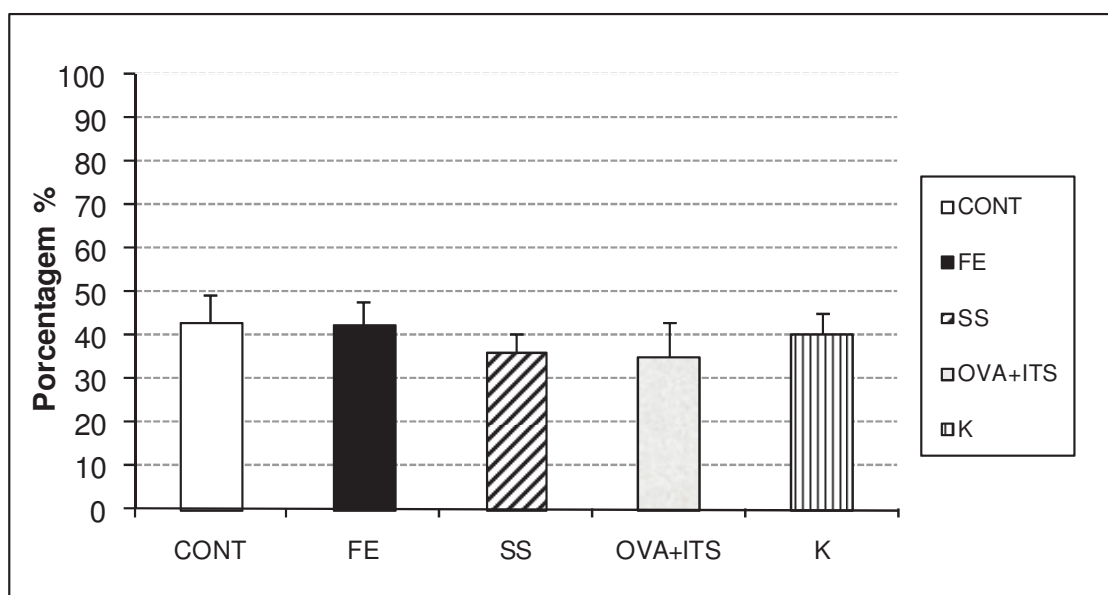


Figura II.16. Representação gráfica da quantificação das taxas de eclosão dos embriões, sob diferentes suplementos protéicos na etapa de MIV.

Tabela II.16. Valores médios (% $\pm$ dp) das taxas de clivagem, produção de blastocistos e eclosão após maturação em meios suplementados com SFB, FE, SS, OVA+ITS e K.

Grupos	Variável		
	Clivagem (% $\pm$ DP) (Clivados/oócitos)	Blastocistos (% $\pm$ DP) (BIs/Clivados)	Eclosão (% $\pm$ DP) (Eclodidos/BIs)
CONT	84,27% $\pm$ 4,88	55,78% $\pm$ 6,49 ^a	43,16% $\pm$ 6,16
FE	83,64% $\pm$ 5,49	56,08% $\pm$ 6,48 ^a	42,65% $\pm$ 5,11
SS	77,86% $\pm$ 5,03	39,80% $\pm$ 7,38 ^b	36,41% $\pm$ 4,76
OVA+ITS	77,72% $\pm$ 4,81	34,19% $\pm$ 2,99 ^b	35,34% $\pm$ 6,83
K	81,11% $\pm$ 6,75	42,37% $\pm$ 4,15 ^b	40,30% $\pm$ 3,98

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

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

NS = Não significativo ($p > 0,05$)

Observamos que os diferentes tratamentos (CONT, FE, SS, OVA+ITS, K) foram semelhantes ($p>0,05$) quanto à taxa de clivagem. Entretanto, quanto à produção de blastocistos, o grupo CONT (55,78%) foi semelhante ($p>0,05$) ao grupo FE (56,08%), e ambos foram superiores ($p<0,05$) aos grupos SS (39,80%), OVA+ITS (34,79%) e K (42,37%). Quanto à taxa de eclosão os grupos CONT, FE, SS, OVA+ITS e K foram semelhantes estatisticamente ($p>0,05$).

Nos sistemas de produção *in vitro* de embriões (PIV) vários parâmetros influenciam o desenvolvimento e a viabilidade embrionária, sendo particularmente importante a condição de cultivo do oócito durante o processo de maturação. O meio de maturação e seus suplementos podem atuar de forma benéfica ou não no desenvolvimento embrionário (BRISON e SCHULTZ, 1997; KRISHER e BAVISTER, 1998). Recentemente Rizos *et al.* (2002) demonstraram que o principal fator que afeta as taxas de blastocistos é a qualidade do oócito, enquanto que as condições do sistema de cultivo *in vitro* influenciam a qualidade de desenvolvimento dos blastocistos. Esta qualidade dos oócitos pode ser relacionada ao período de capacitação observada *in vivo*. Alguns autores acreditam que a competência de desenvolvimento pode ser melhorada se oócitos forem mantidos em bloqueio meiótico por um período (cultura de pré-maturação) antes de retomar a meiose, tentando mimetizar a capacitação (HYTTEL *et al.*, 1997; LONERGAN *et al.*, 2000).

In vitro, diferentes condições de cultivo e protocolos já foram testadas para a maturação de oócitos. Vários meios de maturação têm sido utilizados, tais como: fluido sintético de oviduto (SOF; GANDHI *et al.*, 2000), DMEM, Ham's F-10, Ham's F-12 (SMETANINA *et al.*, 2000) e meio de cultivo tecidual 199 (TCM 199). O TCM 199, proposto por Moor *et al.* (1984), é o meio mais difundido entre os laboratórios de produção *in vitro*, sendo, geralmente, suplementado com soro fetal bovino, FSH, LH, piruvato, glutamina e antibiótico e/ou outros fatores. Esta suplementação tem o objetivo de estimular o desenvolvimento *in vitro* (GUIXUE *et al.*, 2001). Entretanto, existem variações entre os diferentes protocolos de PIV e é evidente que as condições de cultivo têm um efeito significativo em permitir ao oócito

expressar seu potencial, mas os constituintes originais do oócito controlam a sua habilidade de responder às melhores condições (SIRARD, 2001).

Além da utilização de substâncias reconhecidamente reguladoras da maturação nuclear de oócitos em mamíferos, como as citadas anteriormente, outros fatores também estão envolvidos no processo de foliculogênese como o fluido folicular e o cocultivo com células da granulosa (CARNEIRO, 2007).

Willis *et al.* (1991) constataram uma redução significativa na maturação nuclear dos oócitos em meio suplementado com albumina sérica bovina (BSA), quando comparado à utilização de outras fontes proteicas. Entretanto, devido às preocupações sanitárias, a utilização de BSA como suplemento proteico é amplamente difundida na MIV de oócitos (CURCIO, 2005).

Apesar das taxas de maturação nuclear ultrapassarem 90%, o desenvolvimento *in vitro* até o estágio de blastocisto de oócitos bovinos maturados, fecundados e cultivados *in vitro* é geralmente limitado (LONERGAN *et al.*, 2003). Em contraste, os oócitos que são maturados *in vivo*, fecundados e cultivados *in vitro* podem se desenvolver até o estágio de blastocisto em até 80% (BLONDIN *et al.*, 2002).

Na procura de um caminho alternativo que possibilite uma PIV mais eficiente no laboratório, testou-se o emprego de diversas fontes protéicas, FE, SS, OVA +ITS e K, na etapa de maturação *in vitro*. Quanto à produção de blastocistos, somente o grupo FE (56,08%), se assemelhou ($p>0,05$) ao grupo controle (55,78%) e ambos foram superiores ($p<0,05$) aos demais grupos.

De acordo com Leibfried-Rutledge *et al.* (1986), diferente do SFB, a presença de BSA inibe a expansão das células do *cumulus oophorus*, modificando o padrão de mucificação das células da granulosa, indispensável segundo Van Den Hurk e Zhao (2005) para a diferenciação, maturação nuclear, maturação citoplasmática e atividade de transcrição genômica.

Os resultados obtidos corroboram com Saeki *et al.* (1991), que investigaram o uso do SFB como suplemento protéico ao meio de maturação TCM-199, e relataram que o SFB possui influência positiva em relação às taxas de maturação nuclear e citoplasmática. Esta afirmação é justificada pela presença de

uma série de hormônios presentes no SFB. De acordo com os resultados os grupos CONT e FE foram superiores na produção de blastocistos, e não houve diferença significativa quanto à taxa de clivagem nos diferentes grupos testados.

De acordo com Pinyopummintr e Bavister (2004), pode haver clivagem de oócitos maturados e fecundados *in vitro* em meios de cultura simples (semidefinido ou indefinido) ou quimicamente definido (na ausência de suplementação protéica), entretanto, para o desenvolvimento ideal de blastocistos, o SFB é requerido.

Na taxa de produção de blastocistos houve diferenças significativas entre os grupos maturados sob diferentes fontes protéicas.

A produção de blastocistos foi influenciada pelas fontes protéicas utilizadas na etapa de maturação *in vitro*. O SFB e o FE como fontes protéicas na MIV proporcionaram as melhores taxas de produção dos blastocistos.

Em estudos de Ali e Sirard (2002), oócitos cultivados em meios de maturação contendo diferentes concentrações de BSA, fração V (1, 8 ou 20mg/mL) resultaram em taxas de clivagem semelhantes, no entanto o tratamento com ausência de BSA, em meio SOF, durante a etapa de MIV, resultou em maior produção de mórulas e blastocistos, e as demais concentrações de BSA não diferiram entre si. Já os oócitos maturados com ausência de fonte protéica, e diferentes fontes (BSA-V, BSA purificado BSA-FAF, OVA, ou SFB) foram avaliados até a etapa de CIV, onde a presença de BSA-V e SFB significativamente diminuíram a porcentagem de mórulas e blastocistos, enquanto as demais fontes protéicas apresentaram maiores taxas de produção de mórulas e blastocistos.

3.4. Experimento IV: Avaliação da influência de diferentes fontes protéicas (SFB, FE, SS, OVA+ITS e K) nas etapas de maturação, e cultivo *in vitro* e sua consequência no desenvolvimento embrionário

Para avaliação quantitativa, foram utilizados 1626 oócitos bovinos distribuídos em cinco grupos experimentais: CONT, FE, SS, OVA+ITS, K, em cinco repetições. No total dos oócitos avaliados, 1333 (81,98%) clivaram, 591 (36% do total de oócitos ou 44,33% do total de clivados) tornaram-se blastocistos e 242 (14,88% do total de oócitos, ou 18,54% do total de clivados, ou 40,94% do total de blastocistos) eclodiram.

As taxas de clivagem, produção de blastocistos e eclosão para os diferentes tratamentos (cinco grupos experimentais) estão demonstradas nas Figuras II.17, II.18 e II.19.

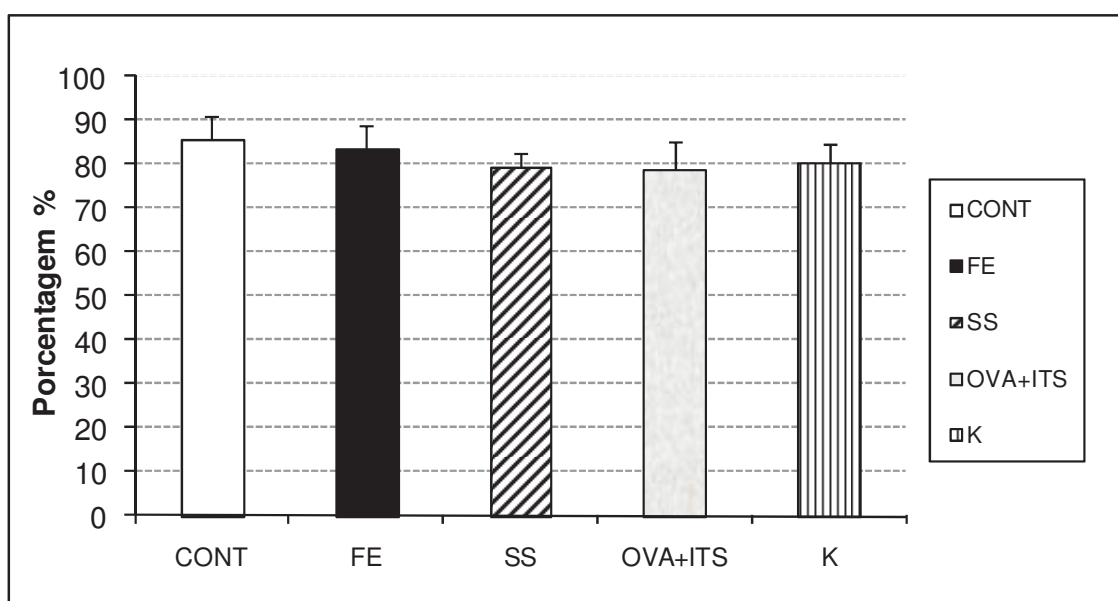


Figura II.17. Representação gráfica da quantificação das taxas de clivagem sob diferentes suplementos protéicos nas etapas de MIV e CIV.

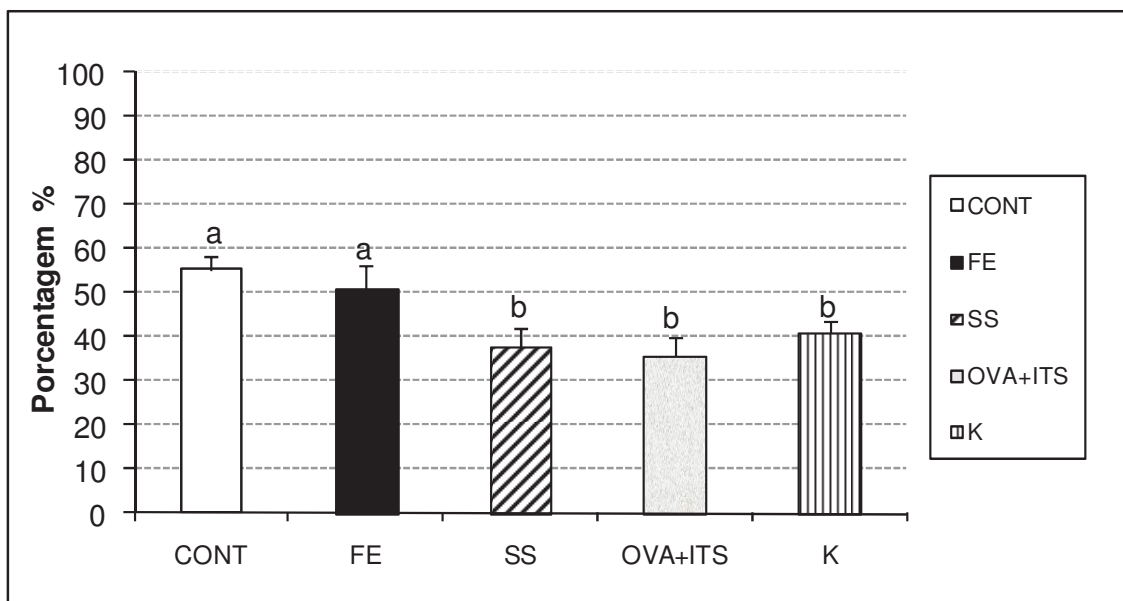


Figura II.18. Representação gráfica da quantificação das taxas de blastocistos expostos a diferentes suplementos protéicos nas etapas de MIV e CIV. ^{a,b}Colunas com sobrescritos diferentes, diferem entre si ($P < 0,05$)

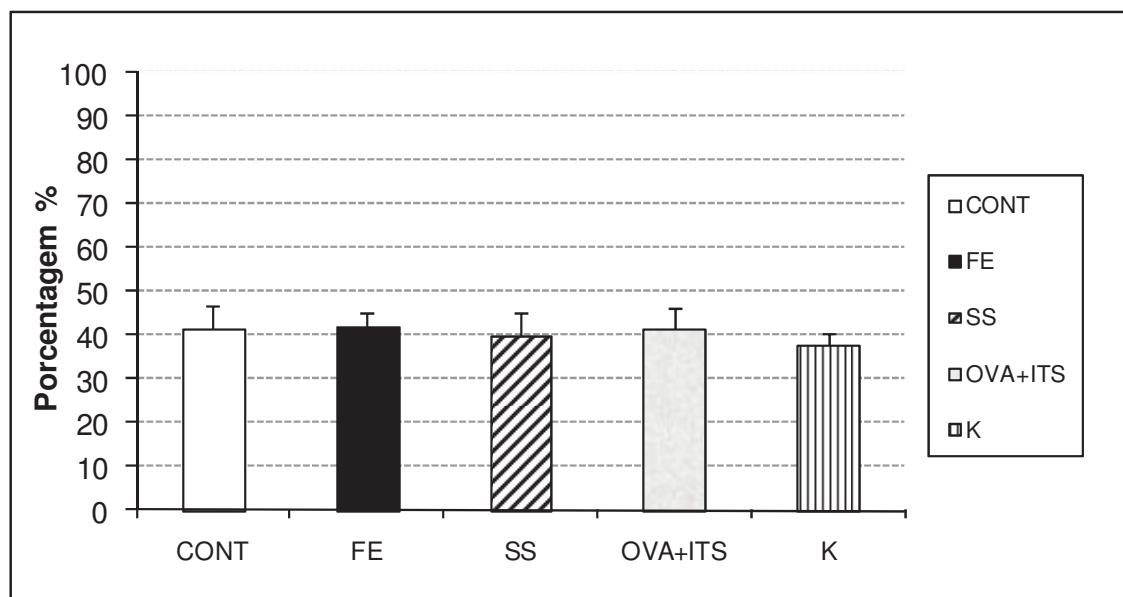


Figura II.19. Representação gráfica da quantificação das taxas de eclosão dos embriões expostos a diferentes suplementos protéicos durante as etapas de MIV e CIV.

Tabela II.17. Valores médios (% $\pm$ dp) das taxas de clivagem, produção de blastocistos e eclosão após maturação e cultivo em meios suplementados com SFB, FE, SS, OVA+ITS e K.

Grupos	Variável		
	Clivagem (% $\pm$ DP) (Clivados/oócitos)	Blastocistos (% $\pm$ DP) (BIs/Clivados)	Eclosão (% $\pm$ DP) (Eclodidos/BIs)
CONT	85,88% $\pm$ 5,06	55,41% $\pm$ 5,06 ^a	41,45% $\pm$ 5,45
FE	83,85% $\pm$ 5,21	50,98% $\pm$ 5,08 ^a	41,86% $\pm$ 3,65
SS	79,44% $\pm$ 3,21	38,04% $\pm$ 4,13 ^b	40,02% $\pm$ 6,56
OVA+ITS	78,89% $\pm$ 6,46	35,60% $\pm$ 4,14 ^b	41,68% $\pm$ 4,76
K	80,68% $\pm$ 4,06	40,97% $\pm$ 2,67 ^b	38,08% $\pm$ 2,63

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

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

NS = Não significativo ($p>0,05$)

Quando as diferentes fontes protéicas foram adicionadas nas etapas de MIV e CIV, respectivamente, foi observado um padrão similar ao obtido com os tratamentos aplicados apenas durante a MIV. Tanto a clivagem quanto a taxa de eclosão não apresentaram diferenças estatísticas ($p>0,05$) entre os grupos. No entanto, quanto à taxa de produção de blastocisto, os grupos Controle e FE ($p<0,05$) foram superiores (55,41 e 50,98% respectivamente) aos grupos SS, OVA+ITS e K (38,04; 35,60 e 40,97%, respectivamente), os quais não diferiram entre si.

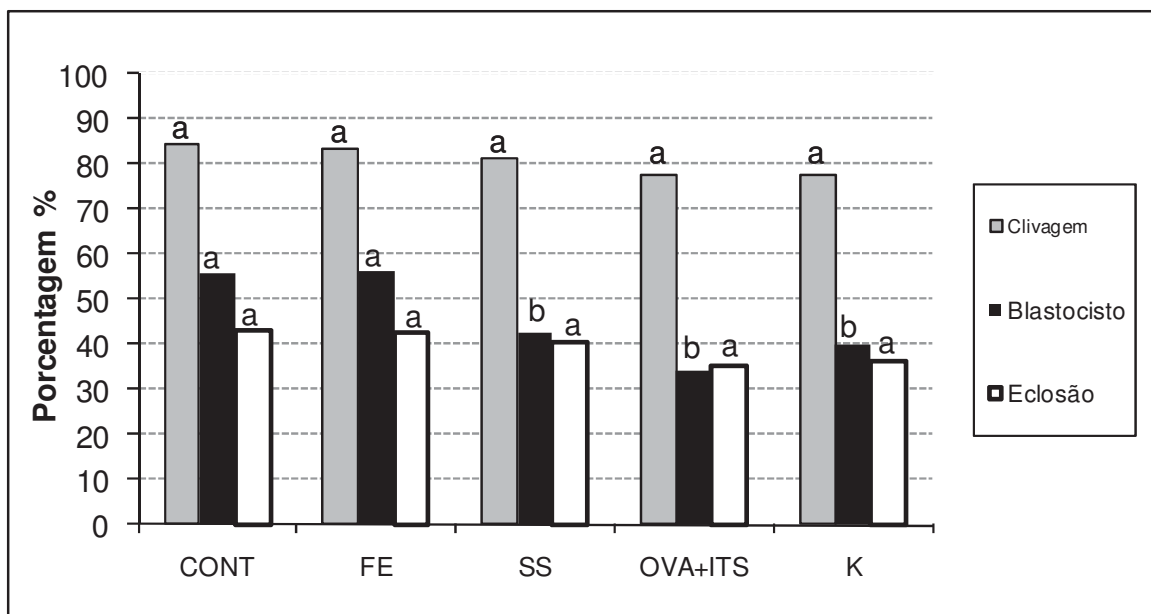


Figura II.20. Representação gráfica da quantificação das taxas de clivagem, de produção de blastocistos, e taxas de eclosão dos embriões, sob diferentes suplementos protéicos nas etapas de MIV e CIV. ^{a,b}Colunas com sobrescritos diferentes dentro de cada categoria (clivagem, blastocisto, eclosão), diferem entre si ($P < 0,05$).

Observamos que os diferentes tratamentos (CONT, FE, SS, OVA+ITS, K) foram semelhantes ($p > 0,05$) quanto à taxa de clivagem. Entretanto, quanto à taxa de produção de blastocistos, o grupo CONT (55,41%) foi semelhante ($p > 0,05$) ao grupo FE (50,98%), e ambos foram superiores ($p < 0,05$) aos grupos SS (38,04%), OVA+ITS (35,60%) e K (40,97%). Quanto à taxa de eclosão os grupos CONT, FE, SS, OVA+ITS e K foram semelhantes estatisticamente ($p > 0,05$).

Vários pesquisadores demonstraram que é possível produzir embriões *in vitro* em sistemas de cultivo sem a adição de soro fetal, ou sem a adição de fontes proteicas de origem animal (ECKERT e NIEMANN, 1995; HOLM *et al.*, 1999). Porém, as proteínas parecem ter um papel importante na antecipação da formação dos pró-núcleos (ECKERT e NIEMANN, 1995). Além disso, os autores verificaram queda significativa nas taxas de clivagem e, posteriormente, de blastocistos, quando submeteram os oócitos ao processo de CIV sem fonte proteica. Ainda há muito a esclarecer, pois não se obteve sucesso na PIV de

embriões bovinos em um sistema totalmente livre de proteínas nas três etapas de produção: maturação, fecundação e cultivo. Embora o ideal seja cultivar os embriões em condições definidas, livres de agentes exógenos, estes meios ainda são pouco aplicados na PIV comercial.

A suplementação protéica é benéfica ao desenvolvimento embrionário in vitro (CAROLAN, 1995), porém dificulta a análise dos fatores que estão envolvidos em todo o processo (BAVISTER *et al.*, 1992). Sabe-se também que o nascimento de bezerros grandes está relacionado com a origem da fonte protéica utilizada no processo de PIV (WALKER *et al.*, 1992).

O estudo conduzido por Mozzaquatro *et al.* (2003) preconizou a retirada total do soro na produção in vitro de embriões bovinos substituindo-o por BSA e PVA. No estudo de Silva (2005), a produção de blastocistos em D7 (28,5%) e D9 (22,2%) foi superior, provavelmente pela adição de soro na fase de maturação. Deve-se ressaltar que no referido estudo, a produção embrionária manteve-se constante nas repetições, provavelmente devido ao uso do PVA, que é uma macromolécula quimicamente definida. Lonergan *et al.* (1999) demonstraram que alterações na partida de soro resultam em alta variabilidade no sistema de cultivo in vitro, dificultando a repetição de resultados entre laboratórios, provavelmente, por apresentar componentes indefinidos tais como, ácidos graxos, fatores de crescimento, aminoácidos e vitaminas.

3.5. Experimento V: Avaliação da influência de diferentes fontes protéicas (SFB, FE, SS, OVA+ITS e K) somente na etapa de cultivo *in vitro* e sua consequência no desenvolvimento embrionário

Para avaliação quantitativa, foram utilizados 603 oócitos bovinos distribuídos em cinco grupos experimentais: CONT, FE, SS, OVA+ITS, K, em cinco repetições. No total dos oócitos avaliados, 459 (76,12%) clivaram, 238 (39,47% do total de oócitos ou 51,85% do total de clivados) tornaram-se blastocistos e 109 (18,08% do total de oócitos, ou 23,74% do total de clivados, ou 45,80% do total de blastocistos) eclodiram.

As taxas de clivagem, produção de blastocistos e eclosão para os diferentes tratamentos (cinco grupos experimentais) estão demonstradas nas Figuras II.21, II.22 e II.23.

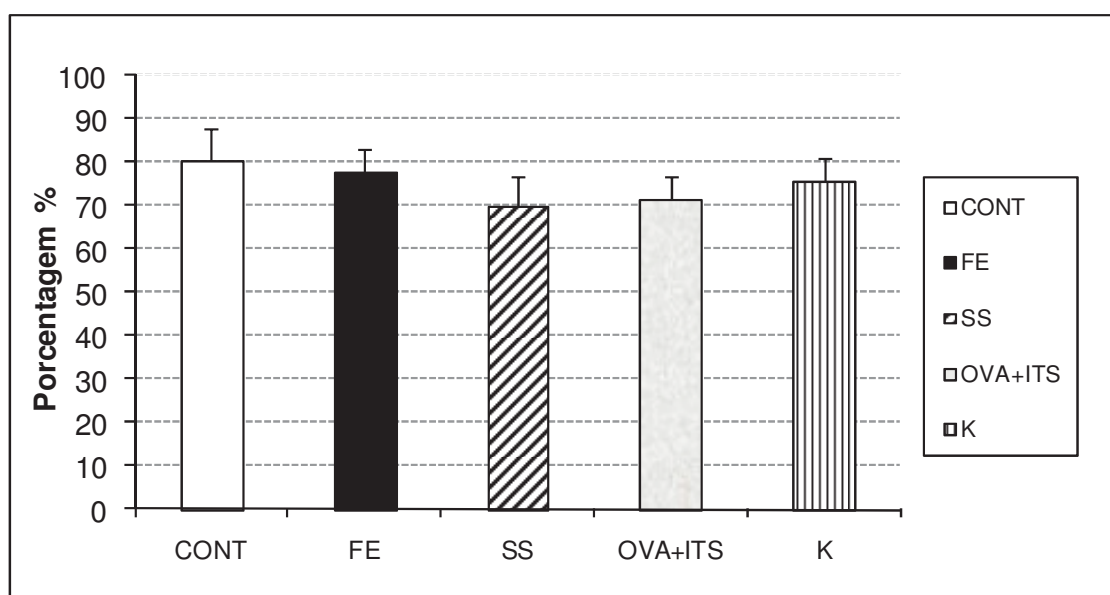


Figura II.21. Representação gráfica da quantificação das taxas de clivagem sob diferentes suplementos protéicos na etapa de CIV.

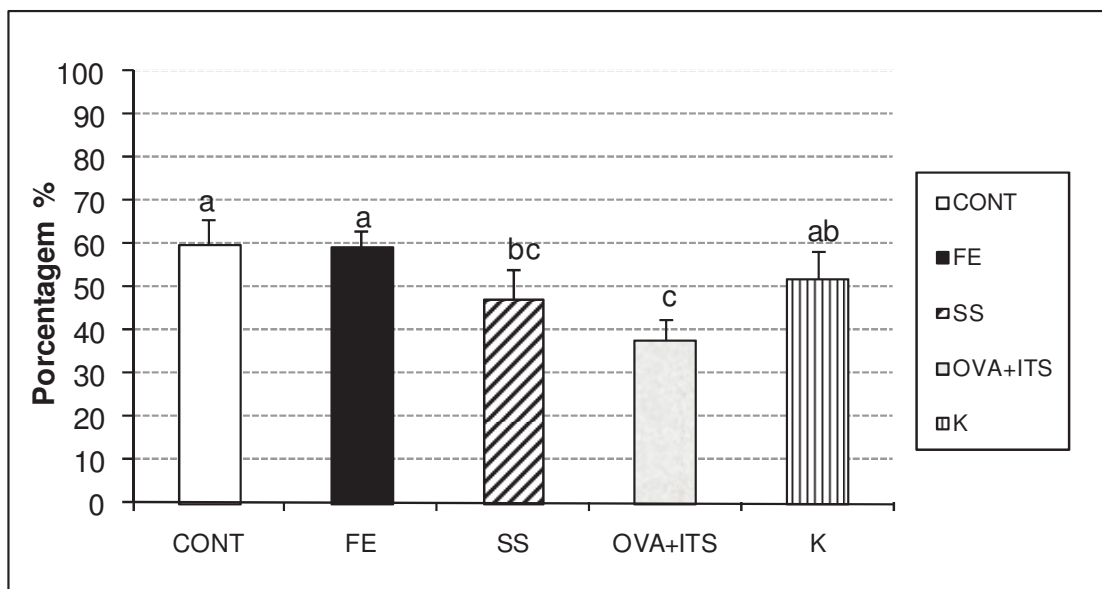


Figura II.22. Representação gráfica da quantificação das taxas de produção de blastocistos sob diferentes suplementos protéicos na etapa de CIV. ^{a,b}Colunas com sobrescritos diferentes, diferem entre si ($P < 0,05$).

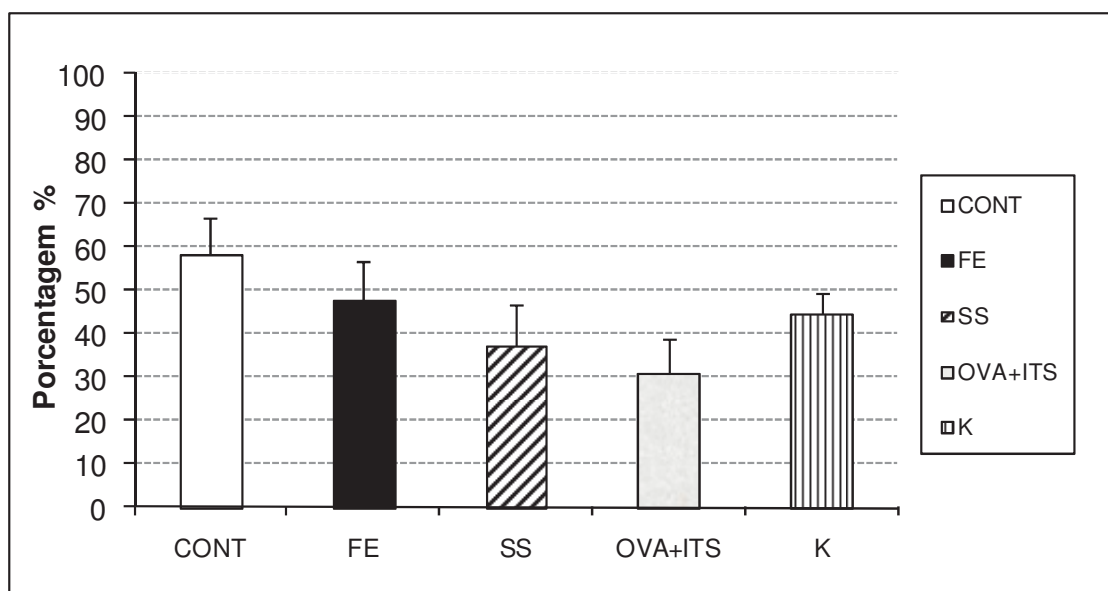


Figura II.23. Representação gráfica da quantificação das taxas de eclosão dos embriões, sob diferentes suplementos protéicos na etapa de CIV.

Tabela II.18. Valores médios (% $\pm$ dp) das taxas de clivagem, produção de blastocistos e eclosão após cultivo em meios suplementados com SFB, FE, SS, OVA+ITS e K.

Grupos	Variável		
	Clivagem (% $\pm$ DP) (Clivados/oócitos)	Blastocistos (% $\pm$ DP) (BIs/Clivados)	Eclosão (% $\pm$ DP) (Eclodidos/BIs)
CONT	80,55% $\pm$ 7,10	60,11% $\pm$ 5,63 ^a	58,23% $\pm$ 9,13
FE	77,68% $\pm$ 5,26	59,27% $\pm$ 3,82 ^a	47,82% $\pm$ 7,51
SS	70,65% $\pm$ 5,31	47,29% $\pm$ 6,75 ^{bc}	37,24% $\pm$ 8,54
OVA+ITS	72,20% $\pm$ 5,46	38,01% $\pm$ 4,52 ^c	31,00% $\pm$ 5,98
K	77,94% $\pm$ 3,10	52,15% $\pm$ 6,08 ^{ab}	43,93% $\pm$ 4,92

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

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

NS = Não significativo ($p > 0,05$)

Quando as diferentes fontes protéicas foram adicionadas somente na etapa de CIV, foi observado um padrão diferente aos obtidos nos experimentos anteriores com os tratamentos aplicados apenas durante a MIV, e aplicados durante a MIV e CIV. Observamos que os diferentes tratamentos (CONT, FE, SS, OVA+ITS, K) foram semelhantes ($p > 0,05$) quanto à taxa de clivagem. Entretanto, quanto à taxa de produção de blastocistos, o grupo CONT (60,11%) foi semelhante ($p > 0,05$) aos grupos FE (59,27%), e K (52,15%), e superior ($p < 0,05$) ao grupo OVA+ITS (38,01%). Quanto à taxa de eclosão os grupos CONT, FE, SS, OVA+ITS e K foram semelhantes estatisticamente ($p > 0,05$).

O fato ocorrido da taxa de clivagem não diferir entre os tratamentos sugeriu que as diferentes fontes protéicas não interferiram até essa etapa, com possível fecundação e início das divisões, mas sem posterior desenvolvimento embrionário igual ou semelhante entre os grupos avaliados.

De acordo com os resultados obtidos por Leivas (2006), a taxa média de clivagem dos oócitos foi de 75%, sendo similar entre os tratamentos BSA, BSA+SFB e BSA+SFBD4. A produção de blastocistos em D7 dos embriões cultivados em meio SOFaaci suplementado com BSA+SFB foi superior ($p<0,05$) em relação aos embriões cultivados somente com BSA e semelhante ao grupo suplementado com BSA+SFB no D4 (47,2%; 34,7% e 43,1%, respectivamente). Porém, a taxa de blastocistos qualidade I em D7 seja com BSA+SFB (34,0%), ou BSA+SFBD4 (32,2%) foi superior ($p<0,05$) aos embriões cultivados somente com BSA (19,9%).

Os resultados obtidos nesse experimento na taxa de clivagem corroboram aos de Leivas (2006), onde a taxa de clivagem não diferiu entre os tratamentos com diferentes fontes proteicas. Estudos demonstraram que não houve diferença na taxa de clivagem ($p>0,05$) entre os grupos BSA, BSA+SFB, entretanto quanto a produção de blastocistos em D7 e a proporção de blastocistos de qualidade I do grupo BSA+SFB foi superior ($p<0,05$) ao grupo BSA (LEIVAS, 2006).

Em adição aos defeitos da membrana plasmática, a peroxidação lipídica pode também danificar o DNA sendo que a peroxidação do DNA pode alterar a cromatina modificando bases e fragmentando o DNA (HUGHES *et al.*, 1996; KODAMA *et al.*, 1999; BAUMBER *et al.*, 2003). Vários estudos reportaram redução do desenvolvimento embrionário após a fecundação de espermatozóides com defeito no DNA (SUN *et al.*, 2001; HOST *et al.*, 2000; MORRIS *et al.*, 2002). Hughes *et al.* (1998) sugeriram que algum defeito de DNA observado em uma população de gametas pode ser removido durante a preparação para a FIV, porém, como este processo também removeu os gametas masculino e feminino da principal fonte de proteção antioxidante, a adição de fontes protéicas no meio resultou na proteção do DNA de defeitos subsequentes.

Garcia (2004) observou que a suplementação com BSA na etapa de CIV originou maiores ($p<0,01$) taxas de clivagem, produção de blastocistos (taxa calculada em relação ao número de oócitos totais) e eclosão (taxa calculada em relação ao número de blastocistos), sendo de 93,5%, 32,3% e 77,1%, em

comparação à suplementação com SFB, as quais foram: 84,0%, 26,7% e 38,7%, respectivamente. Entretanto, Lonergan *et al.* (1998) observou que o SFB acelerou significativamente o desenvolvimento embrionário, promovendo blastulação prematura e aumentando a porcentagem total de blastocistos com maior número de células totais e taxa de eclosão.

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

Embora os meios definidos sejam modelos ideais para se estudar as exigências exatas dos oócitos e embriões em cultivo *in vitro*, e analisar a ação física de variadas substâncias, e ainda também úteis na prevenção de contaminações por patógenos (GANDHI *et al.*, 2000), a suplementação dos meios de cultura com fontes protéicas de origem animal têm apresentado os melhores resultados desde a maturação oocitária até a etapa final de desenvolvimento *in vitro* de embriões (VANROOSE *et al.*, 2001). De acordo com Soria (2005), as taxas de eclosão de embriões bovinos não apresentaram diferenças em relação ao controle e aos tratamentos aos quais foram submetidos, entretanto, em valores absolutos, a eclosão em meios sintéticos (PVA e PVP) foi inferior em relação aos meios orgânicos (SFB e BSA).

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

De acordo com Carolan *et al.* (1995), a remoção do BSA no meio SOF padrão resultou em significativa redução de blastocistos produzidos nos Dias 6, 7 e 8, respectivamente (17 vs 8%; 28 vs 18%; 31 vs 21%; $P < 0,05$), mas a presença

ou ausência de células do *cumulus* circundando os supostos zigotos no cultivo em SOF não promoveram diferença na taxa de clivagem, na porcentagem de embriões de 5 a 8 células ou na produção de blastocistos (Dia 6, 7 ou 8). No entanto, a suplementação com SFB na etapa de CIV reduziu as taxas de produção de blastocistos e a qualidade dos mesmos, pois houve diminuição do número de núcleos e redução da taxa de eclosão em comparação à suplementação com o BSA (GARCIA, 2004).

Diferentes sistemas de cultivo *in vitro* que sustentam o desenvolvimento embrionário podem ser classificados em função da presença ou da ausência de fontes protéicas. Os meios considerados indefinidos contam com a presença de SFB, devido à presença de hormônios, fatores de crescimento e outras substâncias desconhecidas (HOLM *et al.*, 2002), meios que contém o BSA como principal substituto protéico do SFB, são considerados meios semidefinidos, pelo fato de estar ligado a fatores embriotróficos, como proteínas, fatores de crescimento, substratos energéticos e outros contaminantes. Já os sistemas definidos são aqueles constituídos por substâncias previamente conhecidas, como aminoácidos, macromoléculas, dentre elas PVA, PVP, fatores de crescimento e suplementos sintéticos (GORDON, 1994).

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

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

Diversos estudos têm reportado que a suplementação prolongada com SFB nos meios de cultura provoca alterações morfológicas e efeitos deletérios diretos aos embriões, como densidade, coloração, tamanho, metabolismo e a expressão de inúmeros genes (SHAMSUDDIN e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1994; HALL, 1999; KRISHER *et al.*, 1999), além de rupturas ultra-estruturais em organelas, como as mitocôndrias, entre outras alterações prejudiciais (HASLER, 2000; FARIN

et al., 2001). Há também alterações metabólicas, como presença de maior quantidade de grânulos lipídicos em mórulas e blastocistos cultivados em meios suplementados com SFB, em comparação aos cultivados na ausência de suplementação (ABE *et al.*, 1999).

De acordo com Leivas (2006), a adição de 2% de SFB ao meio de cultivo *in vitro* SOFaaci aumenta a produção de blastocistos em D7 e a taxa de blastocistos de qualidade I. Não há diferença na taxa de prenhez de embriões produzidos em meio de cultivo com 0,4% de BSA ou 0,4% de BSA + 2% de SFB, no entanto o uso de 2% de SFB aumenta a eficiência da PIV de embriões bovinos, por aumentar a porcentagem de prenhez produzida em relação ao total de COC maturados. Este fato torna a inclusão do soro no meio de cultivo essencial para otimização dos resultados de PIV.

Nos estudos de Leivas (2006), a adição de 2% de SFB resultou em maior eficiência na PIV de embriões, pelo aumento da produção de blastocistos em comparação ao cultivo efetuado somente na presença de BSA. Outras pesquisas têm demonstrado que o cultivo com soro aumenta a produção de blastocistos independente da fase na qual o mesmo é adicionado (HOLM *et al.*, 1999; PINYOPUMMINTR e BAVISTER, 1994).

3.6. Experimento VI: Verificação da qualidade embrionária através do número de células da MCI, do TF, e total nos embriões CIV

Neste experimento foram utilizados 219 blastocistos, oriundos dos cinco grupos experimentais: CONT, FE, SS, OVA+ITS, K (Tabela 8), em três repetições (39-57 blastocistos por tratamento).

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

As médias de células da MCI, TF e totais dos blastocistos avaliados oriundos dos diferentes tratamentos estão descritas na Tabela II.19 e demonstradas nas Figuras II.24 e II.25.

Tabela II.19. Valores médios do número de células MCI, TF e totais por blastocisto avaliado e valores médios ($\pm$ dp) em embriões produzidos *in vitro* com a utilização de fontes protéicas alternativas na MIV e CIV.

Grupos	<u>Número médio de células</u>		Nº médio de células totais
	(MCI $\pm$ dp)	(TF $\pm$ dp)	
Cont	29,27 $\pm$ 7,85 ^a	63,06 $\pm$ 13,18 ^a	92,33 $\pm$ 16,50 ^a
FE	30,13 $\pm$ 8,23 ^a	63,18 $\pm$ 10,01 ^a	93,31 $\pm$ 14,02 ^a
SS	23,32 $\pm$ 7,58 ^b	45,61 $\pm$ 12,85 ^b	68,92 $\pm$ 16,02 ^{bc}
OVA+ITS	21,09 $\pm$ 6,51 ^b	43,86 $\pm$ 12,19 ^b	64,96 $\pm$ 16,51 ^c
K	21,93 $\pm$ 5,66 ^b	54,34 $\pm$ 11,63 ^c	76,27 $\pm$ 14,05 ^b

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

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

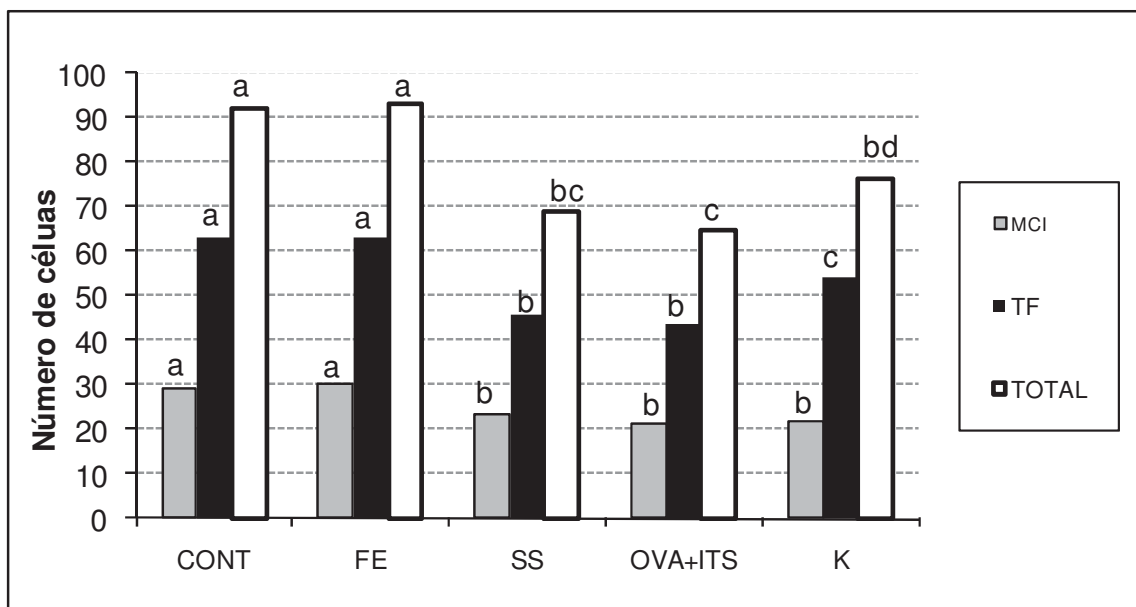


Figura II.24. Representação gráfica da média do número de células da massa celular interna (MCI), nos blastocistos, sob diferentes suplementos protéicos nas etapas de MIV e CIV de produção *in vitro* de embriões bovinos. ^{a,b}Colunas com sobrescritos diferentes dentro de cada categoria (MCI, TF, TOTAL), diferem entre si ($P < 0,05$).

Tanto em relação ao número médio de células da MCI quanto ao número médio de células do TF, os grupos controle e FE ($p > 0,05$) não diferiram entre si. No entanto, foram superiores ($p < 0,05$) nos dois tipos de células (MCI e TF) quando comparados aos demais grupos.

Os grupos controle e FE demonstraram superioridade quanto ao número de células totais ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos. O grupo SS ($p > 0,05$) não diferiu do grupo OVA+ITS; e o grupo SS ($p > 0,05$) não diferiu do grupo K.

Observamos que a média de células da MCI dos blastocistos dos grupos CONT (29,27) e FE (30,13) foram superiores ($p < 0,05$) aos demais grupos. Entretanto, a média de células do TF dos blastocistos do grupo SS (45,61) foi semelhante ($p > 0,05$) ao grupo OVA+ITS (43,86) e foram inferiores ($p < 0,05$) aos demais grupos. A média total de células dos blastocistos do grupo CONT (92,93) foi semelhante ($p > 0,05$) ao grupo FE (93,31) e ambos os grupos foram superiores ($p < 0,05$) aos demais.

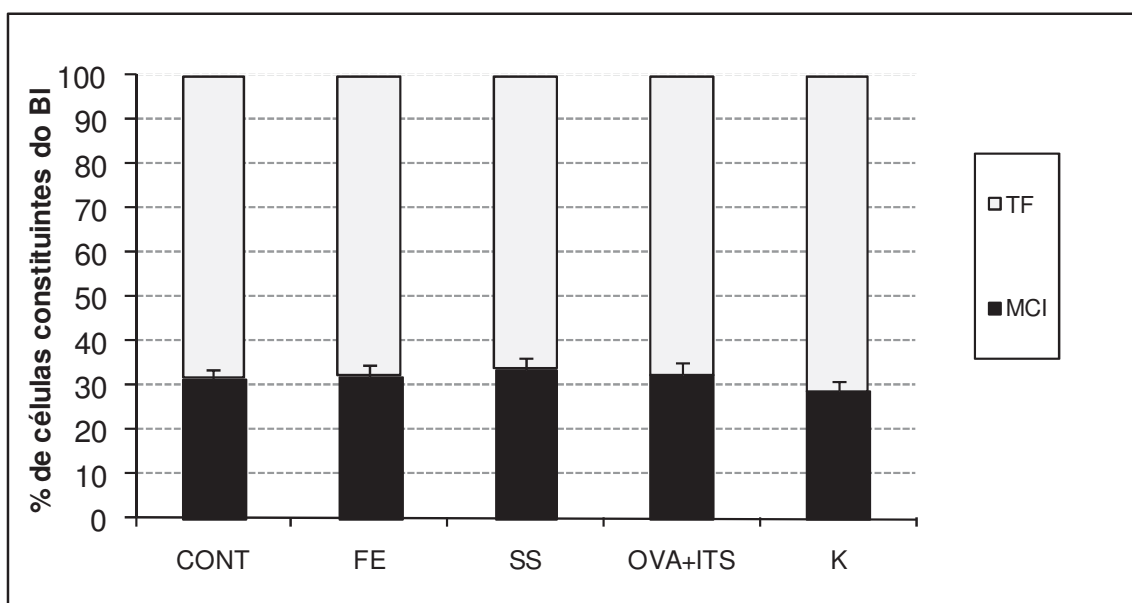


Figura II.25. Representação gráfica da porcentagem média e desvio padrão de células da MCI e do TF, em relação ao número total de células dos blastocistos produzidos sob diferentes suplementos protéicos nas etapas de MIV e CIV.

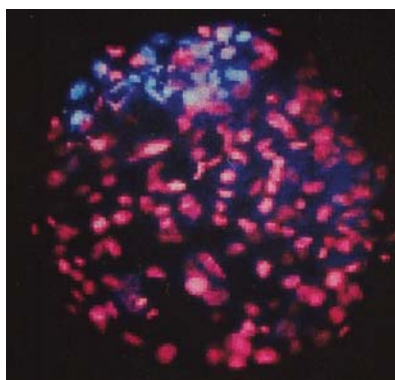


Figura II.26. Fotomicrografia de blastocisto (sete dias após a FIV) avaliados pela técnica de coloração diferencial sob microscopia de epifluorescência. Azul (Hoechst 33342): núcleo das células da massa celular interna; Rosa (iodeto de propídeo + Hoechst): núcleo das células do trofoblasto.

O desenvolvimento do estágio de blastocisto é caracterizado pela diferenciação de células do trofoblasto, que se localizam mais externamente e circundam a blastocèle, e pela formação da massa celular interna (GOPICHANDRAN e LEESE, 2003).

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

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

O trofoblasto atua como uma barreira seletiva no movimento de solutos para dentro e para fora da blastocèle. Em particular, a enzima Na⁺/K⁺-ATPase, localizada nas membranas apical e basolateral do trofoblasto, transporta Na⁺ para o interior da blastocèle, favorecendo a posterior entrada de água por processos osmóticos. A Na⁺/K⁺-ATPase tem sido considerada efetora primária para a formação do blastocisto, por estabelecer e manter um gradiente iônico através do trofotoderma que promove o acúmulo osmótico de água no epitélio (WATSON e

BARCROFT, 2001). Todavia, foi constatado que aquaporinas (AQP) ou canais de água também podem atuar como mediadores do movimento de fluidos através do TF (BARCROFT *et al.*, 2003), sugerindo que a enzima Na⁺/K⁺-ATPase pode não ser um regulador indispensável para a formação da blastocèle e, conseqüentemente, do estágio de blastocisto.

Alguns autores relatam que fontes protéicas com adição de insulina no tratamento de embriões podem promover o aumento no número de células, especificamente na massa celular interna de blastocistos em desenvolvimento (SMITH *et al.*, 1993; SIRISATHIEN *et al.*, 2003). Ainda de acordo com Harvey e Kaye (1990), a insulina aumenta as taxas de compactação e a formação de blastocistos *in vitro*, sendo os blastocistos dotados de 25% a mais de células na MCI. Considerando que a proporção de células presentes na MCI é um fator determinante para a sobrevivência embrionária e o crescimento fetal, o acesso do embrião à insulina materna, durante a pré-implantação, é requerido para a obtenção de um crescimento fetal fisiológico.

Assim como a insulina, o IGF-1 também é um importante regulador do crescimento e da diferenciação celular, apresentando, ainda, um papel mitogênico e antiapoptótico nos embriões em estádios iniciais de desenvolvimento (RILEY e MOLEY, 2006). Estudos têm relatado que a adição de concentrações fisiológicas de insulina ou IGF-1 durante o CIV resulta em redução da apoptose (AUGUSTIN *et al.*, 2003; FABIAN *et al.*, 2004) e/ou aumento na proliferação celular em blastocistos de bovinos (AUGUSTIN *et al.*, 2003).

Embriões cultivados na ausência de proteínas exibem diferenças na sua atividade metabólica, com diminuição da sua capacidade de desenvolvimento (ECKERT *et al.*, 1998; KRISHER *et al.*, 1998) e possuem um menor número de células (LEE *et al.*, 1998) comparados com embriões cultivados na presença de proteína.

Não foi observada diferença ($p>0,05$) entre os tratamentos CONT (29,27) e FE (30,13). Entretanto, a média de células do TF dos blastocistos do grupo SS (45,61) foi semelhante ($p>0,05$) ao grupo OVA+ITS (43,86) e foram inferiores ($p<0,05$) aos demais grupos. A média total de células dos blastocistos do grupo

CONT (92,93) foi semelhante ($p>0,05$) ao grupo FE (93,31) e ambos os grupos foram superiores ($p<0,05$) aos demais. Os resultados mostraram que a fonte protéica FE não prejudicou a subsequente fecundação e nem o desenvolvimento embrionário.

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

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

Estudos de Wolf (2005) não observaram diferença no tratamento com a fonte protéica cisteína associada à cisteamina, semelhante aos resultados de Avelino (2004) no tratamento de cisteína associada ao β -mercaptoetanol. Entretanto, este último autor verificou aumento no percentual de células da MCI no tratamento suplementado com cisteína associada à cisteamina em relação ao controle.

3.7. Experimento VII: Verificação da apoptose através de Coloração “Terminal Transferase Assay” – TUNEL

Avaliação do número de células em apoptose dos embriões CIV

A localização das células apoptóticas foi estimada, visto que não há método preciso de avaliação, já que a distinção é subjetiva e realizada pela aparência das células, onde as células da MCI apresentam-se mais concentradas em um pólo do blastocisto.

Fragmentação de DNA em embriões cultivados por 7 dias: Teste TUNEL

Tabela II.20. Valores médios do número de células totais por blastocisto avaliado e valores médios (% $\pm$ dp) de apoptose em embriões produzidos *in vitro* com a utilização de fontes protéicas alternativas na MIV e CIV.

Grupos	Nº de células totais	Apoptose (%)
Cont	92,33 $\pm$ 16,50 ^a	2,69 $\pm$ 2,18 ^a
FE	93,31 $\pm$ 14,02 ^a	2,76 $\pm$ 2,19 ^a
SS	68,92 $\pm$ 16,01 ^{bc}	5,62 $\pm$ 2,43 ^b
OVA+ITS	64,96 $\pm$ 16,58 ^b	6,30 $\pm$ 3,12 ^b
K	76,27 $\pm$ 14,05 ^c	3,84 $\pm$ 2,20 ^a

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

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

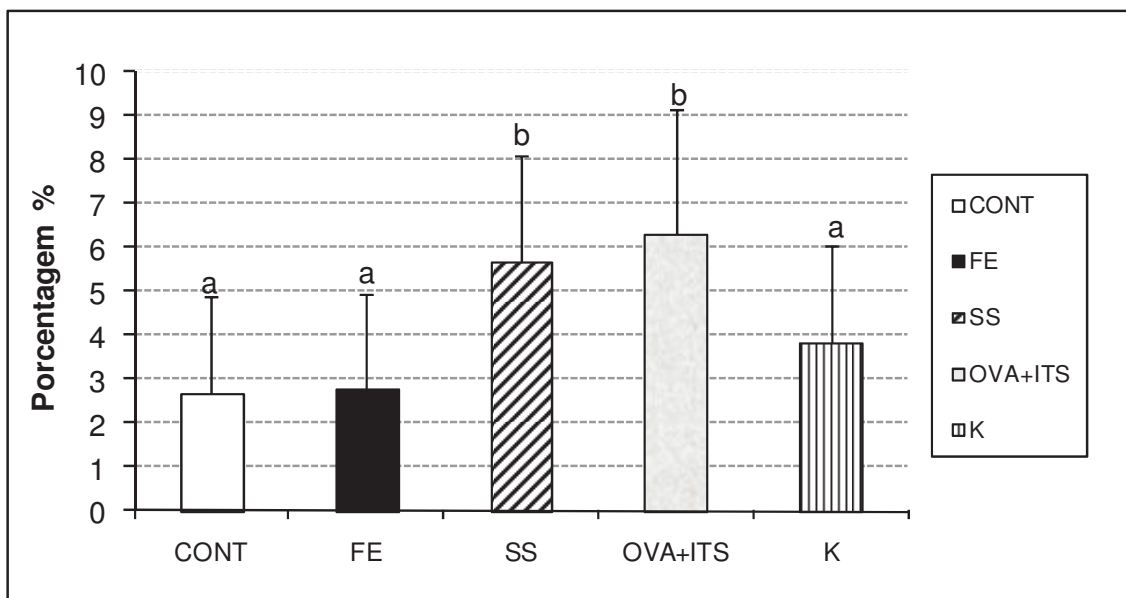


Figura II.27. Representação gráfica do número médio total de células em apoptose.

Os grupos OVA+ITS e SS ($p>0,05$) não diferiram na taxa de fragmentação de DNA, no entanto, demonstraram maior ($p<0,05$) porcentagem de células apoptóticas do que os grupos Controle, FE e K.

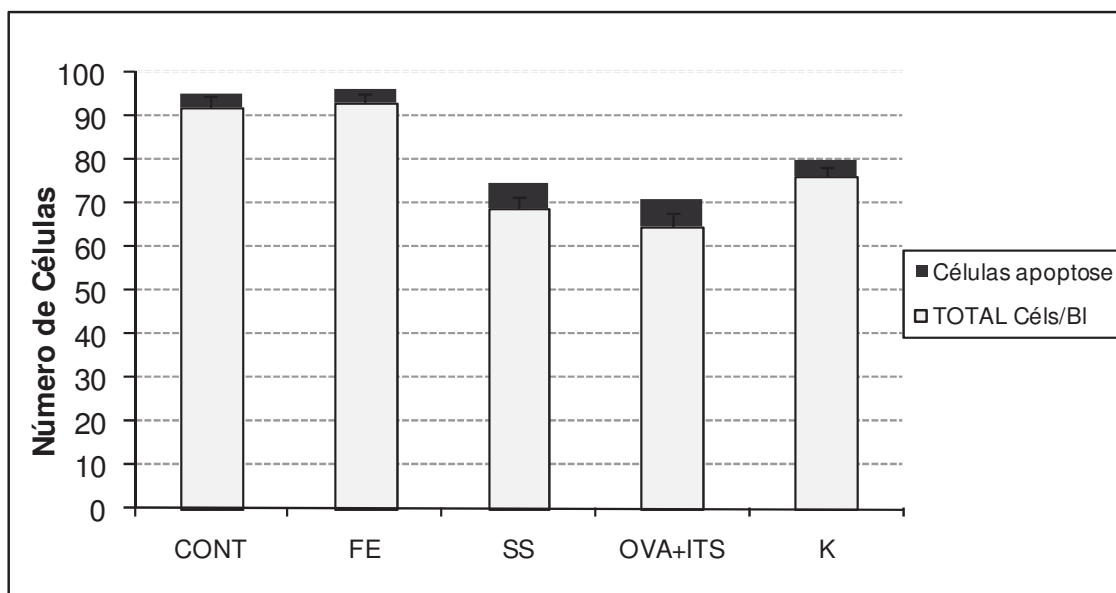


Figura II.28. Representação gráfica do número médio total de células em apoptose, presentes na MCI e TF, em relação ao número médio de células totais por blastocisto.

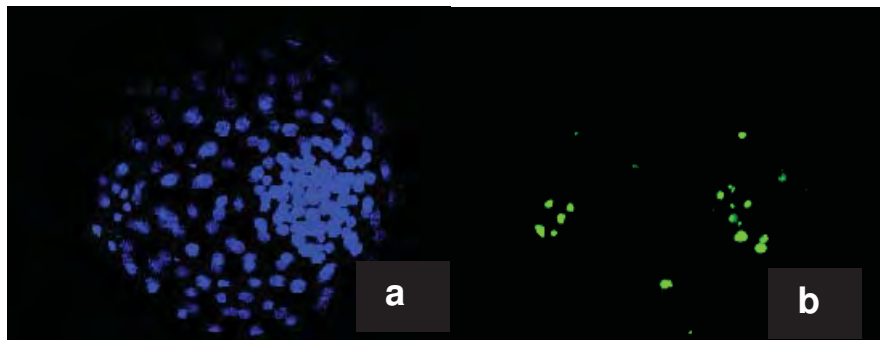


Figura II.29. Blastocistos no dia 7, corados pela técnica de coloração TUNEL, observados em microscópio de epifluorescência. a) Blastômeros corados pelo Hoechst 33342; b) Células com fragmentação do DNA, com núcleo picnótico.

Utilizou-se a técnica de TUNEL para avaliar a porcentagem de apoptose dos embriões e observou-se baixos níveis de defeitos do DNA em blastocistos (dia 7), sugerindo proteção da membrana plasmática pelas fontes protéicas FE e K.

Os grupos OVA+ITS e SS ($p>0,05$) não diferiram na taxa de fragmentação de DNA e apresentaram maior nível de apoptose, ou maior ($p<0,05$) porcentagem de células apoptóticas do que os grupos Controle, FE e K.

O nível de apoptose dos grupos Controle, FE e K foram significativamente ($p<0,05$) menores quando comparado aos demais grupos. Sugere-se que as fontes protéicas OVA+ITS e SS aumentou o percentual de DNA danificados.

O ensaio do TUNEL detecta quebras do DNA. A desoxinucleotídeo transferase terminal é capaz de indicar falha na dupla fita de DNA, independentemente da causa. O método do TUNEL foi julgado como o mais sensível e específico para detecção de apoptose ou morte celular programada. No entanto, a detecção de fragmentos de DNA pelo ensaio do TUNEL pode apresentar falhas em distinguir entre apoptose, necrose e autólise celular (CHARRIAUT-MARLANGUE e BEM-ARI, 1995; GRASL-KRAUPP *et al.*, 1995).

A apoptose é a morte celular programada que ocorre em condições fisiológicas, como na formação da blastocle do embrião, é uma falha característica nesse processo, na ativação de uma endonuclease endógena, gera numerosos fragmentos no DNA (COMPTON, 1992).

Os resultados mostraram que a utilização das fontes protéicas SFB, FE e K promoveram menor porcentagem de apoptose nos embriões analisados. Enquanto que os grupos CONT e FE apresentaram maior número de células totais (92,33 e 93,31) respectivamente.

Muitos estudos demonstraram que espécies reativas ao oxigênio (ROS), em níveis controlados, podem ter funções fisiológicas na tradução de sinais e caminhos como a indução da fosforilação da proteína e alcalinização intracelular (KOSHIO *et al.*, 1981; FIALKOW *et al.*, 1994; BLONDIN *et al.*, 1997). No entanto, quando em excesso podem levar a injúrias como, por exemplo, o câncer, em que as células perdem seu mecanismo de defesa, por inibição dos mecanismos apoptóticos (RACHID, 2002). Como são desconhecidos os valores e inúmeros mecanismos que diferem apoptoses fisiológicas das patológicas, deve-se ter cautela na afirmação da porcentagem de apoptose com qualidade dos embriões.

De acordo com Borges (2008) a utilização do antioxidante no diluidor de sêmen provocou menor porcentagem de apoptose nos embriões analisados. Embora ao separar os touros, quanto ao perfil de qualidade espermática, observou-se que o touro que mais produziu embriões foi também o que demonstrou alta porcentagem de fragmentação do DNA, sendo que o touro que menos produziu embriões, provavelmente por causa da elevada patologia espermática, produziu a menor porcentagem de células apoptóticas. Isto sugeriu que no primeiro caso a apoptose foi fisiológica, ou seja, necessária para o desenvolvimento embrionário e no segundo, em decorrência da alta anormalidade morfológica, pode ter ocorrido um dano genético (lesão ao DNA, porém não detectada) que levou a falha na indução da apoptose.

3.8. Experimento VIII: Avaliação da influência de diferentes fontes protéicas (SFB, FE, SS, OVA+ITS e K) na criopreservação de embriões bovinos.

Neste experimento foram utilizados 266 blastocistos, oriundos dos cinco grupos experimentais: CONT, FE, SS, OVA+ITS, K (Tabela II.21), em três repetições (29-9 blastocistos por tratamento).

Os embriões criopreservados foram descongelados e após 24 a 48 horas, avaliou-se o número de blastocistos eclodidos.

Tabela II.21. Valores médios (% $\pm$ dp) da taxa de eclosão após descongelação em meios suplementados com SFB, FE, SS, OVA+ITS e K.

Grupos	Variável
	Eclosão
	(% $\pm$ DP)
	(Eclodidos/Bls)
CONT	37,74% $\pm$ 2,36 ^{ab}
FE	42,08% $\pm$ 4,04 ^a
SS	27,52% $\pm$ 3,29 ^{bc}
OVA+ITS	16,09% $\pm$ 5,27 ^c
K	39,98% $\pm$ 6,07 ^{ab}

a,b,c,d Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si ($p>0,05$).
NS = Não significativo ($p>0,05$)

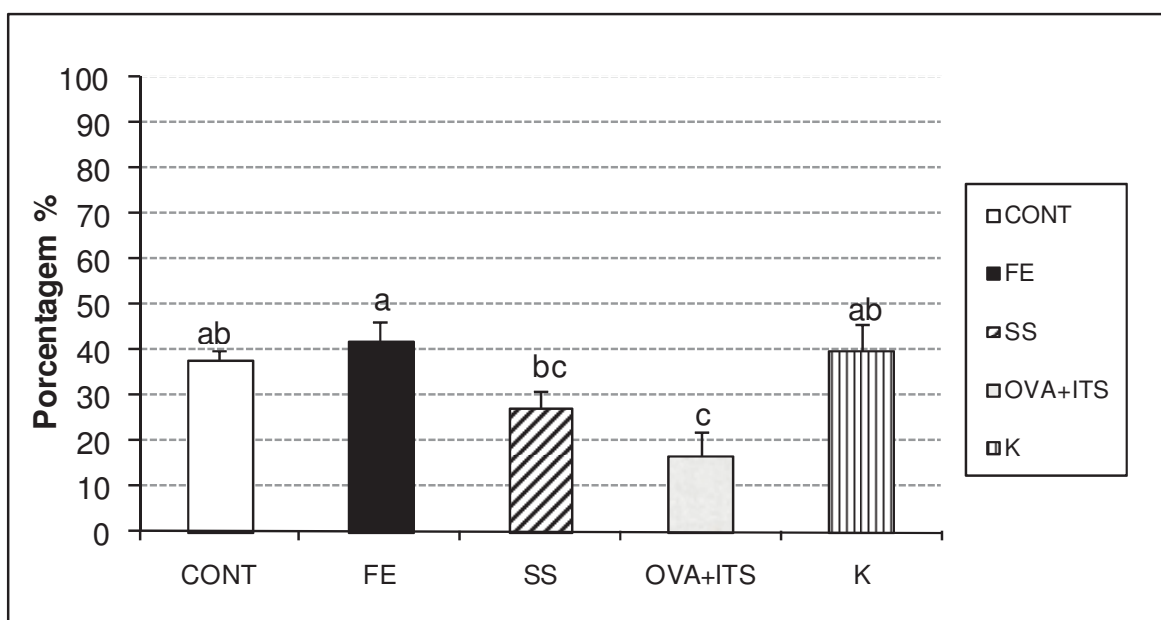


Figura II.30. Representação gráfica da quantificação das taxas de eclosão dos embriões descongelados, sob diferentes suplementos protéicos.

Um dos obstáculos para a extensiva utilização da PIV de embriões bovinos para fins comerciais é a criopreservação. Relatos prévios sugerem que embriões PIV são mais sensíveis às baixas temperaturas e têm uma baixa criotolerância quando comparados com embriões bovinos produzidos *in vivo*. Há uma hipótese para isso: durante o cultivo *in vitro*, as concentrações lipídicas no citoplasma embrionário ficam aumentadas, ocorrendo uma peroxidação lipídica na membrana celular durante o cultivo *in vitro*, o congelamento e o descongelamento (IMAI *et al.*, 2002).

No estudo de Tarin e Trounson (1993), com embriões de bovinos em CR1aa modificado, comprovaram que as maiores taxas de desenvolvimento até o estágio de blastocisto foram no meio CR1aa modificado. Porém, a viabilidade pós-descongelamento dos embriões cultivados em meio CR1aa modificado foi menor quando comparado aos embriões cultivados em TCM-199. Os autores concluíram que esta possível diferença na sobrevivência pós-descongelamento tenha ocorrido pelo fato dos constituintes antioxidantes, como ácido ascórbico e α -tocopherol, estarem presentes somente no meio de cultivo TCM-199. Os danos aos embriões podem ter sido induzidos por uma hiperoxidação irreversível da membrana celular, que é constituída por fosfolipídeos (IMAI *et al.*, 2002).

Uma possibilidade para vencer estas dificuldades quanto à criopreservação é melhorar a qualidade do embrião, proporcionando um ambiente adequado para o seu cultivo e produção *in vitro*. Outra possibilidade é adequar os métodos de criopreservação às necessidades específicas dos embriões produzidos *in vitro* (VAJTA *et al.*, 1998).

A técnica de vitrificação é uma alternativa a ser considerada, pois alguns estudos demonstraram que a sobrevivência de embriões produzidos *in vitro* depois de vitrificados é maior quando comparada com o congelamento convencional (NEDAMBALE *et al.*, 2004). Além disso, ressalta-se a necessidade de modificar e padronizar a técnica de congelamento convencional para que esta se adapte às células a serem criopreservadas, visando, assim, a melhor viabilidade dos embriões produzidos *in vitro*. Em adição, o estabelecimento de protocolos de PIVE que tornem as células mais criotolerantes também deve ser considerada, pois

essa pode ser uma forma de melhorar a maturação oocitária e o cultivo de embriões e, talvez, resultar em uma prole mais saudável (SEIDEL JR, 2006). O uso de componentes não-fisiológicos durante o cultivo in vitro para regular o metabolismo em favor do desenvolvimento é uma boa aposta. Torna-se interessante, portanto, a realização de mais estudos para avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de PES sobre a criotolerância dos embriões in vitro. Dessa forma, será possível definir uma concentração que não seja prejudicial para o desenvolvimento dos embriões e que melhore a viabilidade destes após serem submetidos aos métodos de criopreservação.

4. CONCLUSÕES

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

Na etapa de MIV não houve diferença significativa na utilização de diferentes fontes protéicas. Nessas condições experimentais, as fontes protéicas SFB e FE não afetaram a maturação *in vitro* de oócitos bovinos. No entanto a fonte protéica SS promoveu redução da maturação nuclear.

Na etapa de CIV a produção de blastocistos foi influenciada pelas fontes protéicas utilizadas na etapa de MIV. O SFB e o FE como fontes protéicas na MIV proporcionaram as melhores taxas de produção de blastocistos.

Na avaliação da qualidade embrionária, os grupos suplementados com SFB e FE demonstraram superioridade quanto ao número de células totais em relação aos grupos suplementados com SS, OVA e K.

Na etapa de avaliação de apoptose embrionária, os grupos OVA e SS apresentaram as maiores taxas de fragmentação, ou maiores porcentagens de células apoptóticas quando comparados aos grupos suplementados com SFB, FE e K.

É possível produzir embriões bovinos com fontes protéicas alternativas, sendo o fluido embriônico (FE) a fonte mais promissora, visto que apresentou resultados semelhantes ao SFB.

CAPÍTULO 3 – Utilização da técnica de ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-MS) para avaliação de oócitos maturados e embriões produzidos *in vitro* sob diferentes condições de suplementação durante a etapa de maturação *in vitro*.

1. INTRODUÇÃO

Como técnica analítica das mais versáteis e sensíveis, a espectrometria de massas (MS) é atualmente uma das ferramentas analíticas mais valiosas em diversos estudos nas áreas de Biologia, de Ciências Médicas e de Ciências Tecnológicas. Por MS é possível determinar a massa molecular e quantificar biomoléculas, tais como proteínas, carboidratos, lipídeos e oligonucleotídeos, assim como fragmentá-las de forma a elucidar sua estrutura e confirmar sua identificação (revisado por FERREIRA *et al.*, 2009).

O potencial de aplicação da MS em estudos biológicos tem sido bastante estendido, em razão dos impressionantes avanços observados nos últimos anos nas áreas de genômica, de transcriptômica, de metabolômica, de proteômica, de lipidômica, e do desenvolvimento extraordinário dos equipamentos utilizados nestas plataformas (SIUZDAK, 2006; HOFFMANN e STROOTBART, 2007; FENG *et al.*, 2008). Além disso, novos avanços permitem inclusive a obtenção de imagens por MS (MS “*imaging*”), gerando a oportunidade de estudos com observação da posição de diversas moléculas num tecido intacto, de maneira específica (moléculas-alvo definidas) ou sem especificidade (como em estudos de procura de biomarcadores) (revisado por FERREIRA *et al.*, 2009).

A análise por MS, esquematizada na Figura III.1, consiste na geração de íons por meio de um método de ionização apropriado (exemplo: MALDI, ESI, APPI, APCI, DESI, etc.). Em seguida, os íons são separados por meio de sua relação massa-carga (m/z) em um ou mais analisadores de massas (exemplo: TOF, Quadrupolo, “*ion trap*”, “*ion mobility*”, ICR) e detectados qualitativamente e/ou quantitativamente por meio de um detector, o qual realiza a contagem dos íons. A magnitude do sinal elétrico em função da razão m/z é convertida por um processador de dados, o qual gera o espectro de massas correspondente.

Existem diversos acoplamentos de fontes de ionização e analisadores de massas (exemplo: MALDI-TOF, ESI-QTOF, MALDI-IT) os quais demonstram vantagens para uma ou outra aplicação. Desse modo, a instrumentação em MS é um tema bastante amplo (GROSS, 2004).

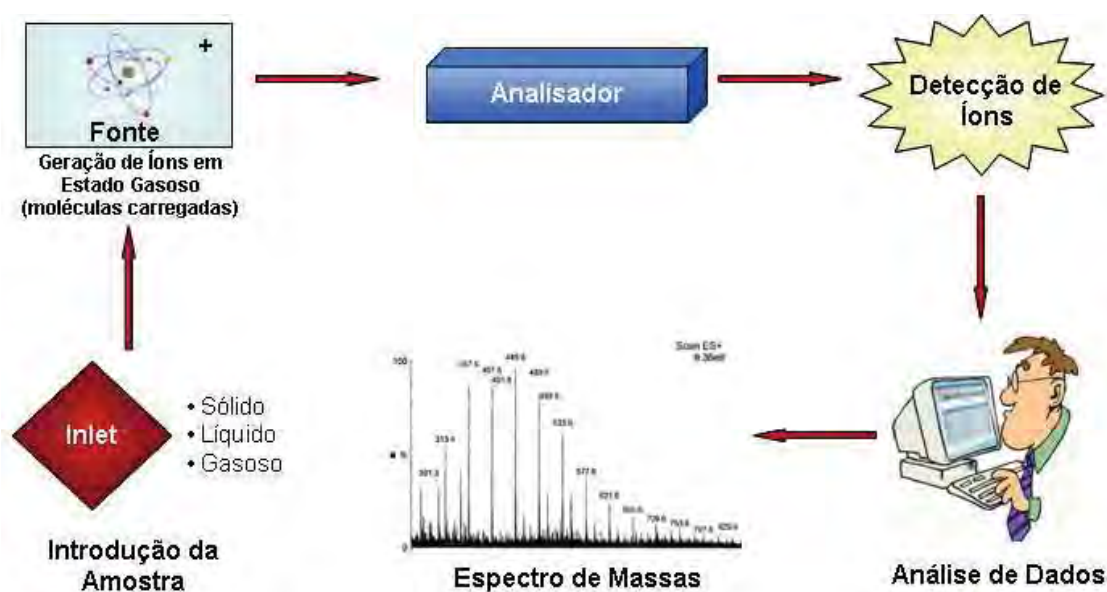


Figura III.1. Diagrama de uma análise por espectrometria de massas (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005).

MALDI é considerada uma técnica de ionização branda, porque os íons formados possuem baixa energia interna.. Esse fato permite a observação de espécies iônicas moleculares com pouca ou nenhuma fragmentação. A produção de íons a partir de compostos de alta massa molecular e não-voláteis, como proteínas e polímeros sintéticos, estendeu a aplicação da MS a todos os tipos de moléculas. As técnicas de ionização branda pioneiras foram “*electrospray*” (ESI) (FENN *et al.*, 1989) e a ionização e dessorção a laser assistida por matriz – MALDI (KARAS e HILLENKAMP, 1988).

Na literatura existem relatos limitados sobre a composição de ácidos graxos livres de oócitos e embriões aplicando-se a técnica de cromatografia gasosa (KHANDOKER *et al.*, 1997, 1998; KHANDOKER e TSUJII, 1999; McEVOY *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2001), a qual necessita de grande quantidade de oócitos ou embriões (100 a 500, tipicamente) e fornece informação estrutural lipídica limitada (apenas composição dos resíduos de ácidos graxos). Desta maneira, a técnica de MALDI-TOF, a qual permite a detecção rápida e identificação de moléculas íntegras de triglicerídeos (TAG) e fosfolipídeos, demonstra grande potencial para aplicação na área de biotecnologia da reprodução animal.

De acordo com diversos estudos (BONI *et al.*, 1999; VAN SOOM *et al.*, 1997; WRIGHT e ELLINGTON, 1995; THOMPSON, 1997; CROISER *et al.*, 2001; HAVLICEK *et al.*, 2009), embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV) possuem menor qualidade, menor viabilidade e maior criosensibilidade em relação aos embriões obtidos *in vivo* pela biotécnica de transferência de embriões (TE). Atualmente, o principal obstáculo para a expansão comercial da PIV no Brasil é a possibilidade de obtenção de taxas de prenhez satisfatórias a partir de embriões criopreservados (jornal “O Embrião”, 2008).

No relatório da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS; THIBIER, 2006), o Brasil foi classificado como o primeiro país em volume de produção de embriões obtidos *in vitro*. Entretanto, a qualidade e a sobrevivência dos embriões produzidos *in vitro* são inferiores à dos embriões obtidos *in vivo* (BONI *et al.*, 1999). As condições e os meios de cultivo embrionário *in vitro* interferem na taxa de clivagem, na ativação do genoma embrionário, na compactação embrionária, na diferenciação e na viabilidade fetal (RIZOS *et al.* 2003; WRENZYCKI *et al.*, 2005).

O desenvolvimento *in vitro* de embriões de murinos foi influenciado pela composição de ácidos graxos do meio de cultivo (KHANDOKER e TSUJII, 1999). A influência de lipídeos na criopreservação de embriões bovinos foi demonstrada, por exemplo, pela utilização de ácido linoléico *trans*-10, *cis*-12 conjugado como suplemento no meio de cultivo embrionário. Este ácido graxo insaturado diminuiu

o depósito de lipídeos citoplasmáticos e melhorou a resistência dos embriões ao processo de criopreservação (PEREIRA *et al.*, 2007, 2008).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil lipídico de oócitos maturados *in vitro* e de embriões bovinos produzidos *in vitro* utilizando-se a técnica de espectrometria de massas por ionização/dessorção de matriz assistida por laser – tempo de voo (MALDI-TOF MS) para investigar os efeitos da suplementação por fontes protéicas alternativas ou suplementos protéicos adicionados aos meios de maturação *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MALDI-MS

Inicialmente, a aplicação da MS era restrita à análise de gases, substâncias voláteis e termicamente estáveis, pois as primeiras técnicas de ionização empregadas (impacto de elétrons e química) eram processos constituídos por duas etapas, nas quais o analito era vaporizado com o aquecimento, e a ionização ocorria quando a molécula estava na fase gasosa. Entretanto, houve o desenvolvimento, em meados dos anos 90, de técnicas para formação de íons moleculares de biomoléculas intactas: a ionização por ESI (FENN *et al.*, 1989) e MALDI (KARAS e HILLENKAMP, 1988).

O desenvolvimento da técnica de MALDI, do inglês “*matrix-assisted laser desorption/ionization*”, causou uma revolução na extensão das aplicações de MS. Os responsáveis pela denominação e desenvolvimento inicial da técnica foram Michael Karas e Franz Hillenkamp (KARAS *et al.*, 1987), os quais aplicaram MALDI para a ionização de compostos sintéticos de alta massa molecular. Ironicamente, o japonês Koichi Tanaka, trabalhando na empresa Shimadzu, recebeu o prêmio Nobel por ter relatado o uso de MALDI para a ionização de proteínas de alto peso molecular (Tanaka *et al.*, 1988).

Pela técnica de MALDI-MS, os íons são obtidos por meio da protonação ou desprotonação de moléculas neutras, ou ainda pela adição de outros íons, como

Na^+ , K^+ , NH_4^+ e Cl^- , com formação de íons denominados adutos. As espécies observadas são, portanto, denominadas espécies protonadas [simbolizadas por $(\text{M} + \text{H})^+$], espécies desprotonadas [simbolizadas por $(\text{M} - \text{H})^-$] ou íons adutos [de sódio, simbolizados por $(\text{M} + \text{Na})^+$ ou de potássio $(\text{M} + \text{K})^+$] (CHAPMAN, 1993).

A Figura III.2 demonstra esquematicamente o processo de ionização e detecção dos íons no espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF.

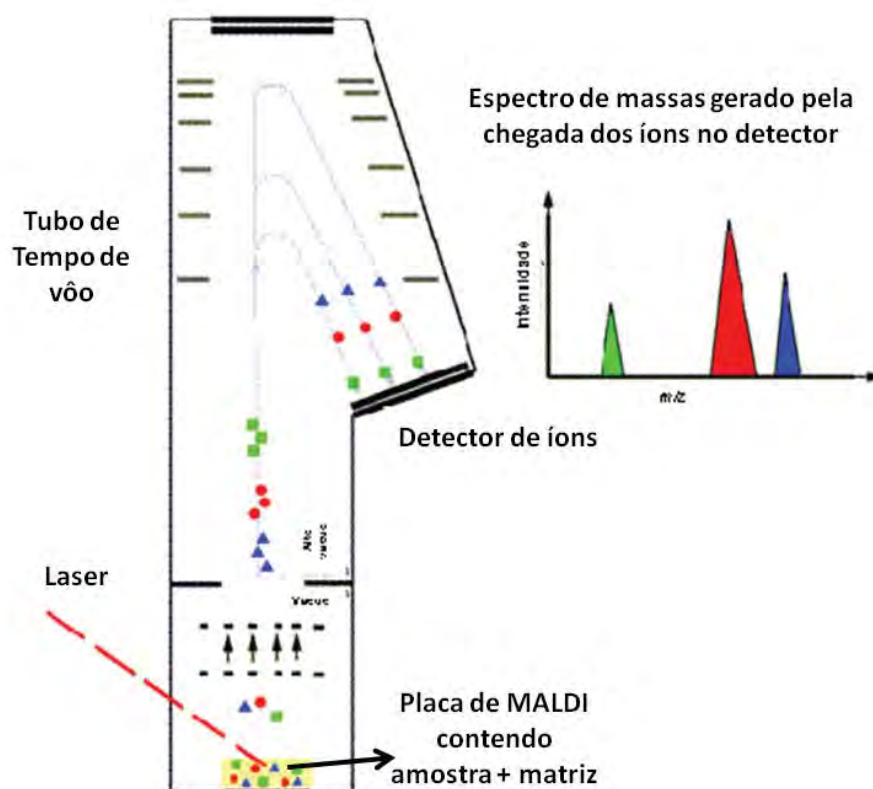


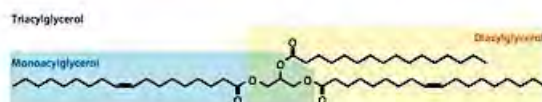
Figura III.2. Espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF. Um feixe de laser causa dessorção e ionização de moléculas (tanto da matriz quanto da amostra) depositadas em uma placa de metal. Uma vez transferidas para a fase gasosa e aceleradas por uma voltagem em polaridade inversa aplicada na placa metálica, as moléculas carregadas são direcionadas da fonte de ionização para o analisador de massas. Analisadores *time-of-flight* (TOF) separam íons de acordo com sua relação massa/carga (m/z).

2.2. Bioquímica de lipídeos e classes de lipídeos detectadas por MALDI-MS

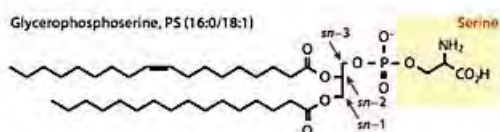
Os lipídeos consistem em um grupo de diversos tipos de compostos insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, contendo longas cadeias de hidrocarbonetos e que são provenientes de organismos vivos (KATES, 1986). Dentre as oito categorias de classificação de lipídeos (ácidos graxos – AG; glicerolipídeos – GL; glicerofosfolipídeos – GF, esfingolipídeos – EL; sulfatídeos – ST; lipídeos prenol – LP; sacarolipídeos – SL e policetídeos – PT (BLANKSBY *et al.*, 2010), vamos dar ênfase aos GL, GF e EL, os quais são comumente detectados em oócitos e embriões utilizando-se MALDI-MS. A Figura III.3 mostra as principais estruturas lipídicas relevantes para a interpretação de perfis lipídicos de oócitos e embriões bovinos.



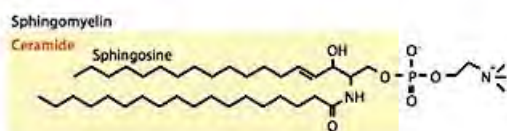
Exemplo de estrutura de ácido graxo



Exemplo de estrutura de glicerolipídeo (monoacilglicerídeo, diacilglicerídeo ou triacilglicerídeo)



Exemplo de estrutura de glicerofosfolipídeo (glicerofosfocolinas, glicerofosfoetanolaminas, glicerofosfoserinas, etc)



Exemplo de estrutura de esfingolipídeo (esfingomielina, ceramida, etc)

Adaptado de Blanksby e Mitchell, 2010

Figura III.3. Estrutura básica de glicerolipídeos, glicerofosfolipídeos e esfingolipídeos detectados nos espectros de massas de oócitos e embriões bovinos. Pode-se observar a estrutura de um ácido graxo, o qual possui número variável de carbonos e diferentes graus de instauração (duplas ligações). Os ácidos graxos fazem parte da estrutura dos GL, GP e EL e são responsáveis pela grande variação de possíveis espécies lipídicas encontradas nestas classes (adaptado de Blanksby e Mitchell, 2010).

Os ácidos graxos livres são ácidos carboxílicos com cadeias de hidrocarbonetos contendo 4 a 36 átomos de carbono (C_4 a C_{36}). A nomenclatura simplificada desses compostos especifica o tamanho da cadeia e o número de duplas ligações, com separação pelo sinal de dois pontos. Por exemplo, o ácido palmítico trata-se de um ácido graxo saturado de 16 carbonos na cadeia, cuja abreviação adotada é 16:0. O ácido oléico, que contém uma ligação dupla e 18 carbonos é abreviado como 18:1. Os ácidos graxos mais comuns (ex. ácido palmítico, mirístico, oléico e ácido linoléico) possuem número par de carbonos e cadeia linear de 12 a 24 carbonos. O número par de carbonos é resultado do modo de síntese desses compostos, o qual envolve a condensação de unidades de acetato (NELSON e COX, 2005).

Uma função de grande importância dos lipídeos é sua participação na composição das membranas celulares. Existem três classes importantes de lipídeos de membranas: os GF, EL e esteróis. Dentre esses, os GF são os mais abundantes e predominantes em membranas. O GF mais simples é o ácido fosfatídico, o qual possui uma molécula de ácido fosfórico ligada a um diacilglicerol. Outros exemplos de GF são a fosfatidilcolina, a fosfatidiletanolamina e o fosfatidilinositol. Os glicolipídeos são os constituintes de membrana principais de membranas celulares em plantas (NELSON e COX, 2005).

Os GL são representados pelos TAG, os quais representam os principais constituintes dos óleos e gorduras, e sua estrutura é formada por uma molécula de glicerol esterificada juntamente a três moléculas de ácidos graxos. A síntese dos TAG não é arbitrária; eles são sintetizados com total especificidade estrutural e apesar de terem função de reserva de energia, seu acúmulo pode prejudicar a função celular em diversas etapas (GURR *et al.*, 2002; SOLOMONS e FRYHLE, 2004).

Os espectros de lipídeos em MALDI- MS contêm íons abundantes na região de 300 a 1.000 Da. Entretanto, devido à interferência de íons provenientes de fragmentação ou “clusters” da matriz utilizada para a análise, os espectros para análise de perfil lipídico são usualmente considerados na faixa de 700 a 950-1.000 Da.

Os EL são representados nos perfis lipídicos de embriões pelas esfingomielinas (EM), as quais aparecem nos espectros de MALDI em forma protonada e sodiada. As EM podem ser quantificadas por MALDI utilizando-se um padrão interno (FUCHS *et al.*, 2010).

Os GF são a classe mais abundantemente detectada por MALDI em oócitos e embriões e até o momento foram caracterizadas fosfocolinas, as quais existem em grande quantidade nas membranas celulares (as quais são responsáveis pela formação da estrutura de bicamada lipídica) e pelo fato de terem uma amônia quaternária em sua estrutura, essas moléculas se ionizam com alta eficiência, suprimindo facilmente outras classes de lipídeos presentes na amostra (DEBOIS *et al.*, 2009).

Os GL são representados pelos TAG, os quais se ionizam pela técnica de MALDI exclusivamente sob a forma de adutos de sódio ou de potássio em modo positivo.

2.3. Análises de lipídeos em oócitos e embriões bovinos

Os métodos comumente utilizados em análises lipídicas de oócitos e de embriões usualmente envolvem extração seletiva de lipídios por manipulação química, separação e caracterização individual de componentes por técnicas de cromatografia, como cromatografia gasosa (KHANDOKER *et al.*, 1997, 1998; KHANDOKER e TSUJII, 1999; McEVOY *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2001). Entretanto, a análise de lipídeos de amostras biológicas por MALDI-MS tem se expandido em várias áreas, principalmente para estudos de MALDI- *fingerprinting* e MALDI- *Imaging* (FUCHS *et al.*, 2010).

Recentemente, a técnica de MS tem sido utilizada com sucesso em estudos de lipídoma de membranas celulares, como células-tronco, e diversos outros modelos biológicos (SCHILLER *et al.*, 2004, 2007; FUCHS e SCHILLER, 2008d; FUCHS *et al.*, 2008b,c).

A técnica de MS, devido à sua alta sensibilidade, permite estudar o perfil lipídico de um único oócito ou embrião, sem processos que envolvem manipulação química e separação de compostos. Além disso, permite a identificação de lipídeos intactos e não somente do perfil de resíduos de ácidos graxos. As informações sobre os lipídeos são relevantes para estudos visando criopreservação de oócitos e embriões de bovinos, já que existem fortes evidências de que a composição lipídica está relacionada à resistência do embrião ao congelamento (revisado por FERREIRA *et al.*, 2009). Sabe-se que o perfil de lipídeos de membranas está associado às propriedades físico-químicas da membrana celular e, portanto, a respostas ao resfriamento, congelamento e descongelamento envolvem propriedades de empacotamento de moléculas de lipídeo, fluidez de membrana, permeabilidade e comportamento em fase térmica (NELSON e COX, 2005).

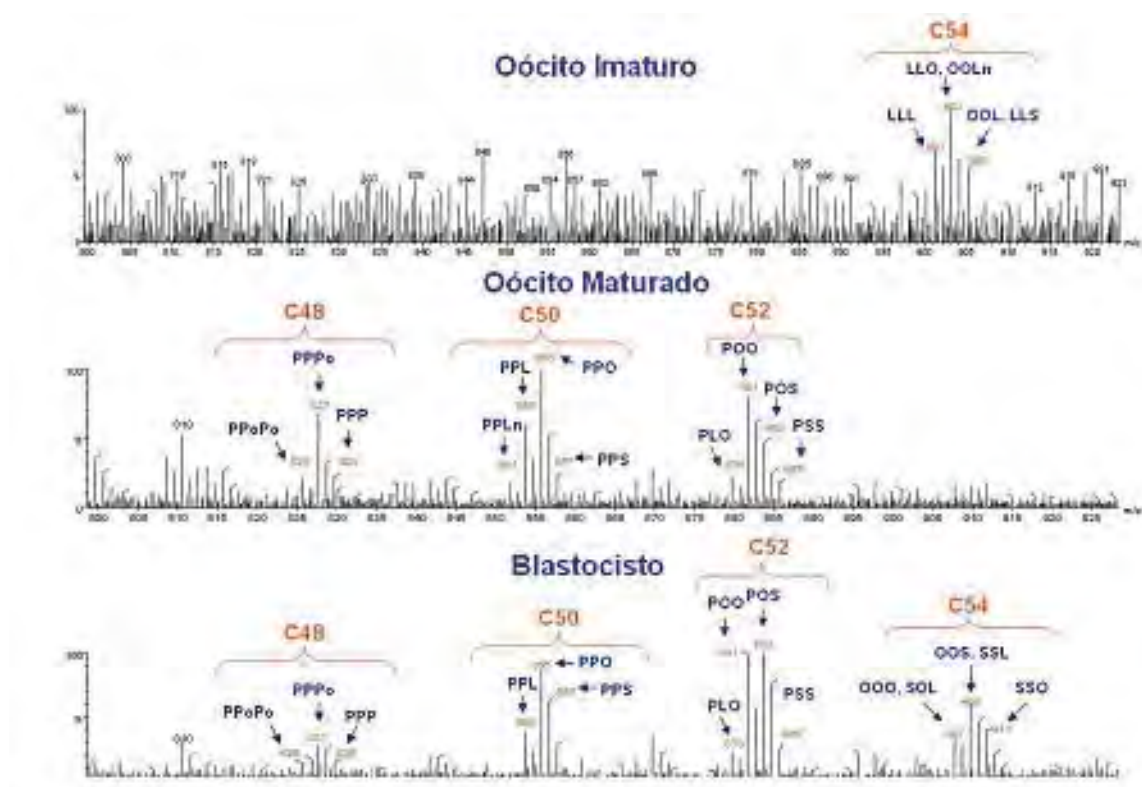


Figura III.4. Espectros de massas que indicam TAG de um oócito imaturo, de um oócito maturado e de um blastocisto. Os espectros foram obtidos por espectrometria de massas por dessorção e ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) com matriz ácido 2,5,-dihidróxido benzóico (DHB) (FERREIRA *et al.*, 2009).

3. OBJETIVO GERAL

- Estudar o perfil lipídico de oócitos maturados *in vitro* e embriões produzidos *in vitro* sob diferentes condições de maturação *in vitro*.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar oócitos maturados *in vitro* pela técnica MALDI-MS, investigando os efeitos da substituição de SFB e BSA por fontes protéicas alternativas (*embryonic fluid, serum replacement, ovalbumin + ITS, knockout*) adicionadas ao meio de maturação *in vitro*.
- Analisar por quimiometria as diferenças no lipidoma obtido e correlacionar os dados com as informações sobre criosensibilidade existentes na literatura ou obtidos experimentalmente para os diferentes grupos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A obtenção dos espectros de massas foi realizada no Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (IQ-UNICAMP), sob coordenação da pesquisadora Dra. Christina Ramires Ferreira e do professor Dr. Marcos Nogueira Eberlin.

Foi utilizada a técnica de MALDI-MS para estudo do perfil lipídico de oócitos bovinos maturados *in vitro* e embriões produzidos *in vitro*. Essa técnica é utilizada na análise estrutural de peptídeos, proteínas e também carboidratos.

4.1. Reagentes

Metanol (ACS/HPLC grade) foi adquirido de Burdick e Jackson (Muskegon, MI, USA) e 2,5- ácido diidroxibenzóico (DHB) foi adquirido de ICN Biomedicals (Aurora, OH, USA). Água ultra pura, purificada por Direct-Q water system (Millipore, Bedford, MA, USA), foi utilizada para preparação das soluções utilizadas.

4.2. Obtenção de oócitos bovinos

Para a realização dos experimentos de MIV e PIV no departamento de Reprodução Animal da FCAV, UNESP Jaboticabal, foram utilizados ovários de fêmeas bovinas abatidas em frigorífico localizado na cidade vizinha de Sertãozinho, SP.

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

Ovários bovinos obtidos em abatedouro foram transportados ao laboratório, em solução salina a 30-35°C, e seus folículos ovarianos (com diâmetro entre aproximadamente 3 a 8 mm) foram aspirados com auxílio de seringas descartáveis (20 mL) com extremidade de agulha (18-G).

O fluido folicular aspirado foi transferido para tubo cônico de poliestireno de 50 mL e decantado por 15 min para a separação dos oócitos. Posteriormente, o sedimento foi transferido para placas de poliestireno de 60 mm de diâmetro, e visualizado em microscópio estereoscópico, com aumento de 20 a 80 X para proceder à seleção dos oócitos.

Foram selecionados para a maturação, oócitos de *cumulus* compacto, com pelo menos, três a quatro camadas de células do *cumulus*, e ooplasma de granulação uniforme. Os oócitos aspirados foram selecionados segundo Loos et al. (1991).

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

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

Os oócitos foram maturados *in vitro* (MIV) em meio TCM-199 com sais de Earle (Gibco 31.100; Grand Island, NY, EUA) suplementado de acordo com os tratamentos: Controle (Crypion®; 10% SFB), BSA (4mg/mL BSA), FE (Sigma® E1761, 10% FE), SR (Sigma® S0638, 20µL/mL SS), OVA (Inlab® Cód.1860, 4mg/mL) e K (10% K) de acordo com a Tabela 1, e 1,0µg/mL de FSH (Pluset®, Calier), 50UI/mL de hCG (Profasi®, Serono), 1,0µg/mL de estradiol (Sigma E-2758), 0,20mM de piruvato de sódio (Biochemical 44094) e 83,4µg/mL de amicacina (Biochimico).

Tabela III.1. Tratamentos utilizados na etapa de maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

Maturação – MIV	Suplementação
SFB	SFB (10%)
BSA	BSA (4mg/mL)
FE	Embryonic fluid (10%)
SR	Serum replacement (20µL/mL)
OVA	Ovalbumin (4mg/mL) + ITS
K	Knockout (10%)

SFB = soro fetal bovino; BSA = albumina sérica bovina; FE = fluido embriônico; SR = Substituto do soro; OVA = ovalbumina; K = Knockout.

4.2.2. Produção *in vitro* de embriões bovinos

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

A metodologia para obtenção, seleção e maturação *in vitro* dos oócitos bovinos foi desenvolvida como anteriormente, descrita no item 4.2.1.

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

Oócitos maturados *in vitro* oriundos dos 6 tratamentos com diferentes suplementos protéicos (SFB, FE, SS, BSA OVA+ITS e K), foram fecundados *in vitro* na presença de BSA (6mg/mL).

A fecundação *in vitro* (FIV) foi realizada após 24h de MIV, em gotas de 100µL de meio TALP-FIV [meio TALP com 30µg/mL de heparina (Sigma H-3149), 18µM de penicilamina (Sigma P 4875), 10µM de hipotaurina (Sigma H-1384) e 1,8µM de epinefrina (Sigma E-4250)], contendo 0,2mM de piruvato de sódio, 83,4µg/mL de antibiótico, amicacina e suplementado com 6mg/mL de BSA, cobertas com óleo mineral.

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

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

4.2.5. Cultivo *in vitro* (CIV)

Após o término da incubação com os espermatozóides, os prováveis zigotos foram submetidos ao cultivo de desenvolvimento (CIV) em placas de 4 poços Nunc®, com 500 µL de meio SOF suplementado com 0,5% de BSA e 2,5% de SFB, cobertos com óleo mineral, em, atmosfera com 5% de CO₂ em ar, e umidade saturada, à temperatura de 38,5°C, durante 7 dias, para atingirem o estágio de blastocisto (dia 0 = dia da fecundação). Após 96 horas foi realizado o “*feeding*” ou troca de meio, retirando-se 50% do meio de cultivo e adicionando-se a mesma quantidade de meio recém-preparado.

4.2.6. Coleta de oócitos e de embriões para perfil lipídico por MALDI-MS e processamento das amostras

Para realização da técnica de MALDI-TOF MS, oócitos submetidos à MIV ou blastocistos obtidos após 7 dias de desenvolvimento (CIV), foram retirados do meio e lavados três vezes em PBS + 0,1% de PVA para eliminar qualquer fonte de lipídeo que possa ser proveniente do meio de cultivo.

Foi preparada uma solução de 50% metanol (grau de pureza HPLC) em PBS. Foram colocados 200µL da solução para cada microtubo, onde foram guardados os oócitos e embriões (1 a 5 embriões ou 10 a 50 oócitos por microtubo).

As amostras foram armazenadas a temperatura de -80°C até o processamento e análise por MALDI-MS. Os microtubos contendo as amostras foram transportados em gelo seco até o Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (IQ-UNICAMP).

A preparação para a análise de MS envolveu a colocação de cada embrião ou conjunto de cinco oócitos em um espaço demarcado da placa de MALDI (denominado “spot”), a qual foi realizada no dia anterior à análise sob estereomicroscópico. Após a colocação dos oócitos e embriões na placa de

MALDI, Figura III.5, a mesma foi deixada em temperatura ambiente *overnight* (ou seja, até o momento da coleta dos espectros). A localização de cada embrião ou dos oócitos dentro dos “spots” da placa de MALDI foi demarcada visando concentrar o laser no local correto local durante as análises. Pouco antes das análises, 1 μ L de 1,0mol/L 2,5- ácido diidrobencóico (DHB) em metanol foi colocado sob cada spot.

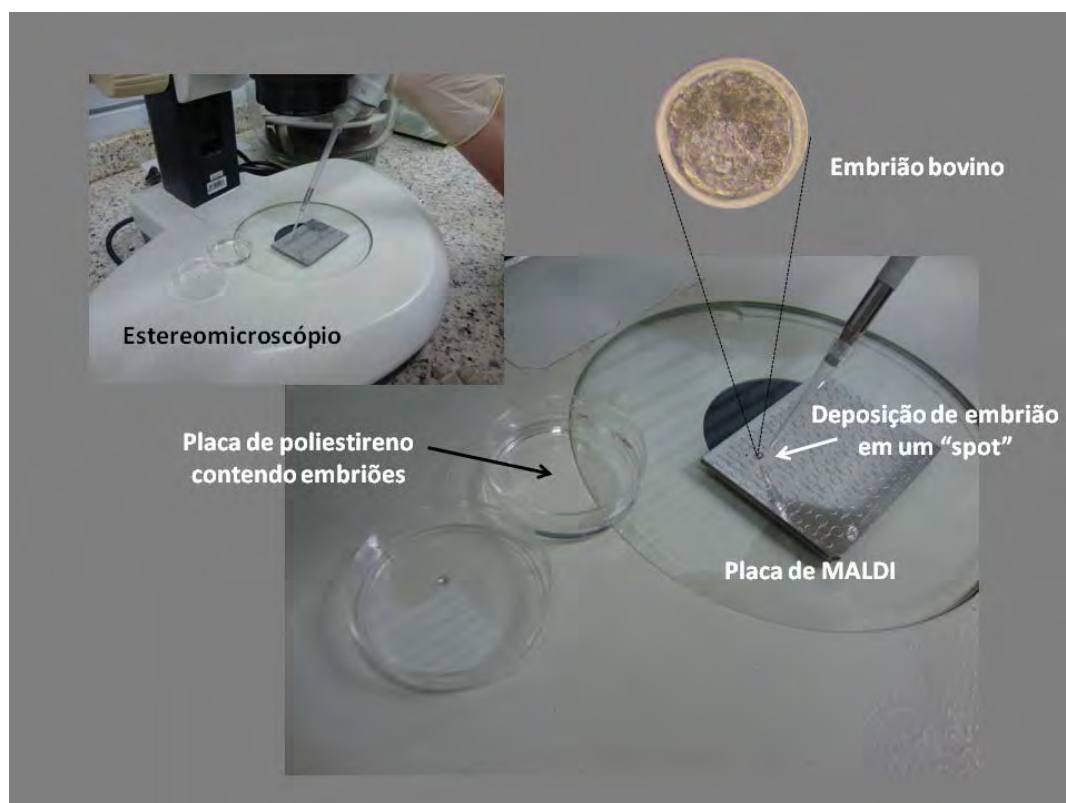


Figura III.5. Com auxílio de estereomicroscópio, os oócitos e embriões foram transferidos das placas de poliestireno para a placa de MALDI, onde cada conjunto de cinco oócitos ou um único embrião ocupou um “spot”. Pouco antes da análise, cada “spot” foi recoberto com 1 μ L de solução de matriz orgânica, a qual possui a função de auxiliar no processo de ionização de moléculas de lipídeo (fosfatidilcolinas, esfingomielinas e triacilgliceróis) presentes nas amostras.

O processo de ionização por MALDI é geralmente auxiliado por um composto orgânico cuja função é absorver a energia do laser e transferi-la de forma “branda” para a molécula do analito (isto é, sem causar fragmentação molecular). A ionização pode ocorrer por meio da adição de carga positiva (modo positivo de ionização) ou de uma carga negativa (modo negativo de ionização). Neste trabalho foi realizada somente a ionização em modo positivo, visto que a mesma promove a obtenção de perfis lipídicos mais informativos (ou seja, com maior quantidade de íons).

A coleta de espectros de massas foi realizada em equipamento MALDI-SYNAPT (Waters, Manchester, UK) em modo manual. Cada espectro foi adquirido por cerca de 1 minuto direcionando o laser para região onde o embrião foi colocado (como ilustrado na Figura III.6) observando-se a formação do espectro de massas. Para o processamento de dados, os espectros foram acumulados e processados (em relação à linha de base e suavização) no software MassLynx v.4.0 (Waters, Manchester, UK).

A análise estatística por PCA (análise de componentes principais) foi realizada a partir de uma matriz de dados construída com auxílio dos softwares MarkerLynx (Waters, Manchester, UK) e Excel (Microsoft, Redmond, WA, EUA) a partir dos valores de m/z e intensidade relativa dos íons observados no perfil por MALDI. A análise de componentes principais (PCA) foi realizada no software Pirouette 3.11 (Infometrics Inc, EUA).

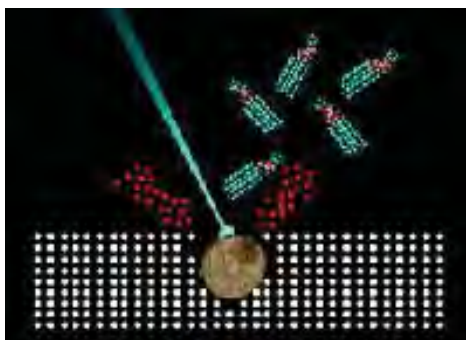


Figura III.6. A figura ilustra o momento que o laser causa impacto ao embrião e fosfolípidos são ionizados, gerando o espectro (adaptado de FERREIRA *et al.*, 2010).

4.5. Delineamento Experimental Para as Análise de Perfil Lipídico por MALDI-TOF

As amostras de oócitos e de embriões foram provenientes de seis grupos experimentais: suplementação com ovalbumina (OVA), soro fetal bovino (grupo-SFB), BSA (grupo-BSA), com “*serum replacement*” (grupo-SR), fluido embrionário (grupo-FE), e com Knockout (grupo-K).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A obtenção do perfil lipídico de oócitos e embriões por MALDI é rápida, relativamente simples e informativa, como esquematizado na Figura III. 5. Pequenos grupos de oócitos (três a cinco) são transferidos sem nenhum processamento, a não serem lavagens para retirar lipídeos presentes no meio de cultivo, para uma placa metálica MALDI, a qual pode ser lavada e utilizada inúmeras vezes.

Durante o processo de ionização por MALDI, logo em seguida ao pulso de laser e consequente ionização das moléculas presentes na amostras, um pulso de alta voltagem em polaridade inversa (7 a 10 Kv) é aplicado na base da placa de MALDI, acelerando os íons recém-formados para passarem pelo analisador de massas (tipo tempo-de-vôo ou TOF) e serem detectados para a formação do espectros de massas.

É possível obter o perfil lipídico de um único oócito. Entretanto, como no perfil lipídico em modo positivo de ionização utilizando matriz DHB os lipídeos provenientes de membranas (fosfocolinas e esfingomielinas) são predominantes, a pequena quantidade de membranas presentes em um único oócito permite a obtenção de espectros pouco intensos comparados aos espectros obtidos a partir de blastocistos.

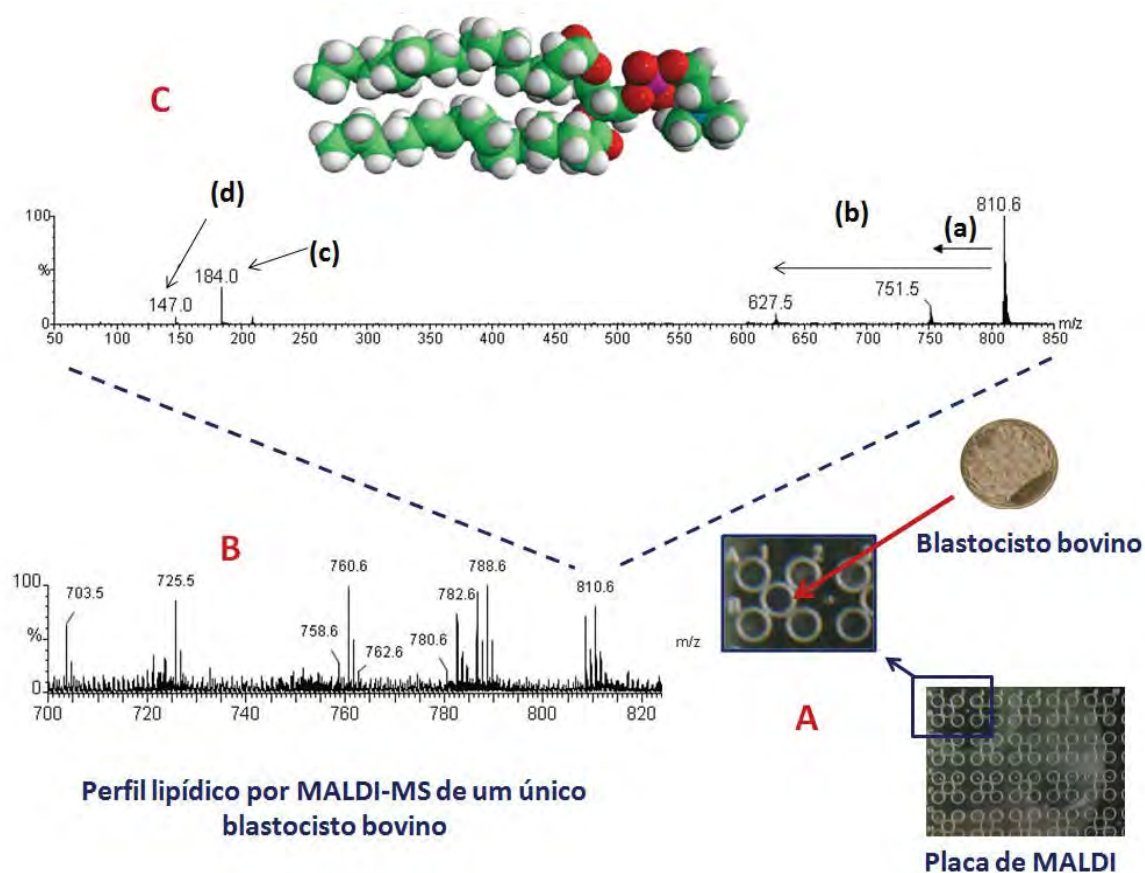
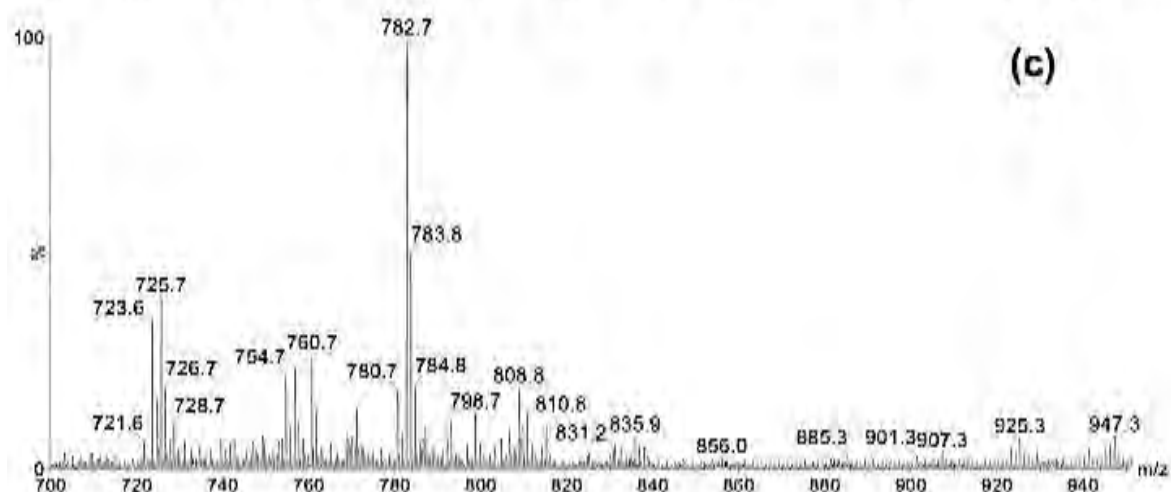
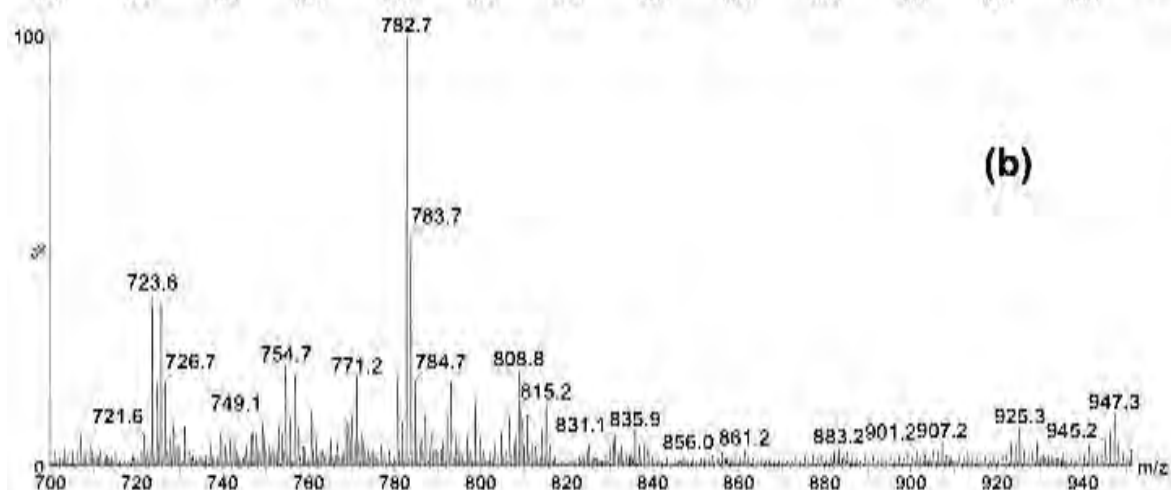
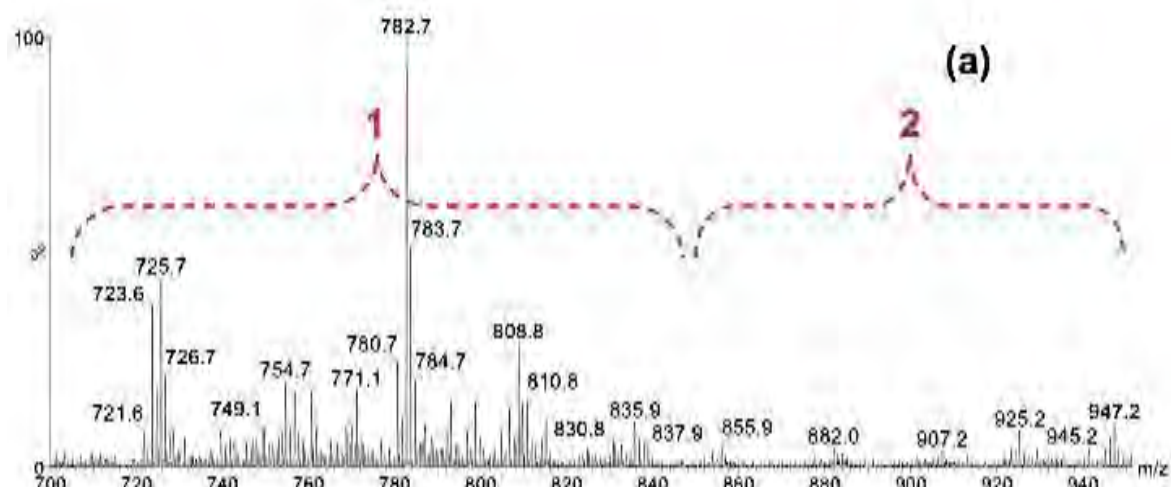


Figura III. 7. Etapas de obtenção do perfil lipídico de embriões por MALDI-MS. A: Pequenos grupos de oócitos ou um único blastocisto bovino é colocado em um spot da placa de MALDI (96 ou 384 posições) com auxílio de estereomicroscópio, e recoberto pela matriz orgânica. B: Um feixe de laser dissolve e ioniza os lipídeos presentes no embrião, os quais são detectados pelo equipamento. O espectro de massas mostra as m/z na abscissa (eixo X) e a intensidade relativa na ordenada (eixo Y). C: Para realizar a caracterização estrutural do lipídeo, pode-se realizar um experimento de fragmentação de uma espécie lipídica de interesse (experimento MS/MS). O exemplo mostra a fragmentação do íon de m/z 810.6, o qual gerou perdas neutras de 59 Da em (a) e 183 Da (b) e os íons 184 Da (c) e 147 Da (d). Estes fragmentos são diagnósticos da estrutura das fosfocolinas.

Portanto, optamos por gerar os espectros de massas colocando cinco oócitos por “spot” para obter um único espectro de massas. Para a análise estatística por PCA foram considerados oito espectros do grupo-OVA (correspondentes a 40 oócitos), nove espectros do grupo-SFB (correspondentes a 45 oócitos), 11 espectros do grupo-BSA (correspondentes a 55 oócitos), 11 espectros do grupo-FE (correspondentes a 55 oócitos), nove espectros do grupo-SS (correspondentes a 45 oócitos) e 13 espectros do grupo-K (correspondentes a 65 oócitos). Um espectro de massas representativo de cada grupo experimental encontra-se na (Figura III. 8).



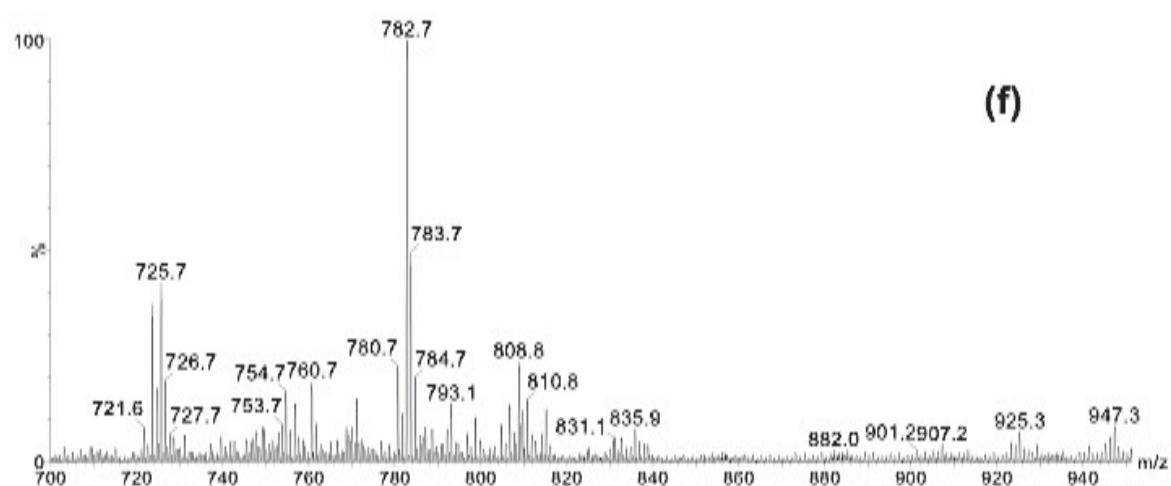
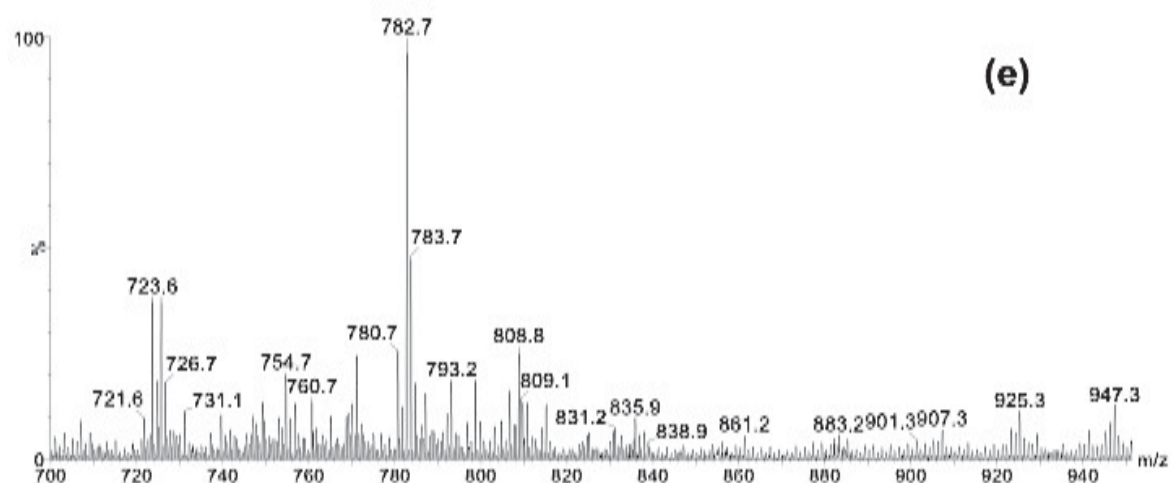
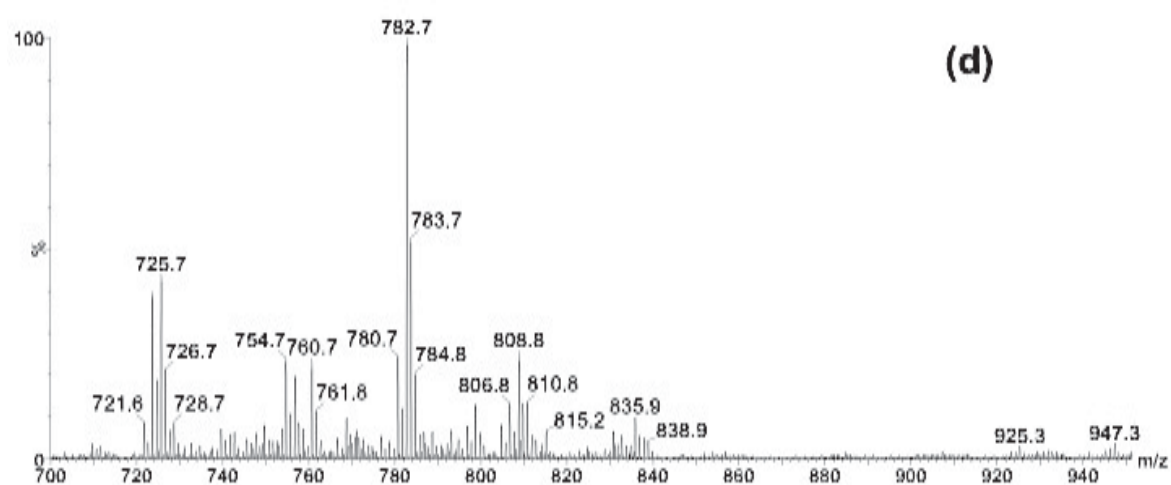


Figura III.8. Espectros de massas contendo o perfil lipídico de oócitos dos seis grupos de MIV. Os espectros foram obtidos por MALDI-TOF MS com matriz DHB em modo positivo de ionização. **(a)** Grupo-OVA, **(b)** grupo-SFB **(c)** grupo-BSA, **(d)** grupo-FE, **(e)** grupo-SS, **(f)** grupo-K. **(1)** corresponde à região onde se encontra maior concentração de esfingomielinas e fosfocolinas e em **(2)** está a região do espectro de massas onde pode-se observar diversos valores de m/z correspondentes a TAG. Ver tabela III.1.

Devido à grande facilidade de ionização de lipídeos em MALDI e especialmente utilizando a matriz DHB, podemos observar que o espectro de massas de oócitos intactos é dominado por valores de m/z correspondentes a lipídeos, principalmente fosfocolinas, apesar de sabermos que existem proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e diversos metabólitos em oócitos. As fosfocolinas são mais ionizadas devido à presença de um amônio quaternário em sua estrutura, o qual corresponde à colina (Figura III.3). Os espectros obtidos por MALDI-MS podem ser otimizados para outros compostos utilizando-se outras matrizes, diferentes faixas de massas e modos de ionização. Essa técnica é ainda pouco explorada para análise de embriões, e por sua sensibilidade e potencial informativo há boas perspectivas para seu uso em pesquisas relacionadas à biotecnologia de embriões bovinos e de outras espécies domésticas.

Por meio da observação visual dos espectros obtidos a partir dos seis grupos experimentais de oócitos maturados *in vitro*, podemos observar que em todos eles houve predominância do íon de m/z 782,7, o qual provavelmente corresponde à fosfocolina sodiada contendo 34 carbonos e uma insaturação: [PC (34:1) + Na]⁺. Podemos observar esta mesma espécie lipídica em sua forma protonada ou [PC (34:1) + H]⁺ em m/z 760,7.

A formação de espécies lipídicas ionizadas como adutos de sódio ou potássio é comumente observada em amostras biológicas, naturalmente ricas nesses elementos. A presença de 34 carbonos nos resíduos de ácidos graxos esterificados e uma insaturação na espécie de fosfocolina mencionada provavelmente corresponde à presença de um ácido palmítico (16:0) e um ácido oléico (18:1), os quais são os resíduos de ácidos graxos mais abundantes em oócitos e embriões, segundo relatos de análises de CG.

A confirmação da atribuição estrutural de uma espécie lipídica em MS é efetuada por experimentos de fragmentação (ou MS/MS), os quais não foram realizados nas amostras deste trabalho, mas foram relatados para outro experimento envolvendo embriões e oócitos bovinos (FERREIRA *et al.*, 2010). A Tabela III.2 considera também atribuições realizadas por outros autores em outros modelos biológicos.

Devido à grande variabilidade estrutural de lipídeos (diversas classes, variável número de carbonos e de insaturações nos resíduos de ácidos graxos), existem diversos isômeros estruturais. Esses isômeros estruturais apresentam os mesmos valores de m/z nos espectros de massas, e podem ser diferenciados por experimentos de fragmentação. Isômeros ópticos como *cis* e *trans* exigem técnicas mais refinadas para sua diferenciação e toda uma área de MS tem sido recentemente desenvolvida nesse sentido (ENDERS e MCLEAN, 2009).

Tabela III.2. Valores de m/z de lipídeos observados nos espectros de massas com suas respectivas possibilidades de atribuição e indicação das referencias que relataram a identificação estrutural por MS/MS.

m/z	Lipídeo (número de carbonos: insaturações)	Referências
703,5	[SM (16:0) + H] ⁺	1,5
723,5	[PC (34:1) + Na] ⁺ and loss of N(CH ₃) ₃	4
725,5	[SM (16:0) + Na] ⁺	3,5
731,5	[SM (18:0) + H] ⁺	1
732,5	[PC (32:1) + H] ⁺	1
734,6	[PC(32:0) + H] ⁺	1
753,6	[SM (18:0) + Na] ⁺	1
754,6	[PC (32:1) + Na] ⁺	1
756,6	[PC (32:0) + Na] ⁺	4, 5
758,6	[PC (34:2) + H] ⁺	1, 2, 5
760,6	[PC (34:1) + H] ⁺	3
762,6	[PC (34:0) + H] ⁺	2
780,6	[PC (34:2) + Na] ⁺ , [PC (36:5) + H] ⁺	1, 2, 5
782,6	[PC (36:4) + H] ⁺ , [PC (34:1) + Na] ⁺	2-5
784,6	[PC (34:0) + Na] ⁺	5
786,6	[PC (36:2) + H] ⁺	1, 3, 5
788,6	[PC (36:1) + H] ⁺	2,3
802,6	[PC 36:5 + Na] ⁺	7
804,6	[PC (38:7) + H] ⁺ , [PC36:4 + Na] ⁺	5, 7
806,6	[PC (38:6) + H] ⁺ , [PC36:3 + Na] ⁺	7
808,6	[PC (38:5) + H] ⁺ , [PC (36:2) + Na] ⁺	1-3, 5
810,6	[PC (38:4) + H] ⁺ , [PC (36:1) + Na] ⁺	1-3, 5
828,6	[PC (38:6) + Na] ⁺	7
830,6	[PC (38:5) + Na] ⁺	3
832,6	[PC (38:4) + Na] ⁺	1, 5
834,6	[PC (40:6) + H] ⁺	2
836,6	[PC (40:5) + H] ⁺	3
851,7	PPLn (50:3) + Na ⁺	6
853,7	PPL (50:2)+ Na ⁺	6
855,7	PPO (50:1) + Na ⁺	6
856,6	[PC (40:6) + Na] ⁺	4
877,7	PLL (52:4) + Na ⁺	6
879,7	PLO (52:3) + Na ⁺	6
881,7	POO (52:2) + Na ⁺	6

883,7	POS (52:1) + Na ⁺	6
895,7	TAG (54:9) + Na ⁺	7
897,7	TAG (54:8) + Na ⁺	7
899,7	LLL _n (54:7) + Na ⁺	6
901,7	LLL (54:6) + Na ⁺	6
903,7	LLO, OOL _n (54:5) + Na ⁺	6
905,7	OOL, LLS (54:4) + Na ⁺	6
907,7	OOO, SOL (54:3) + Na ⁺	6
909,7	OOS, SSL (54:2) + Na ⁺	6
911,7	SSO (54:1) + Na ⁺	6
919,7	LLO, OOL _n (54:5) + K ⁺	6
921,7	OOL, LLS (54:4) + K ⁺	6
923,7	OOO, SOL (54:3) + K ⁺	6
925,7	OOS, SSL (54:2) + K ⁺	6

L: ácido linoléico; L_n: ácido linolênico; O: ácido oléico; P: ácido palmítico; PC: fosfatidilcolina; SM: esfingomielina; S: ácido esteárico. Correspondência das referências citadas: 1: Brügger *et al.*, 1997; 2: Petkovic *et al.*, 2001; 3: Fuchs *et al.*, 2009; 4: Hayasaka *et al.*, 2008; 5: Burnum *et al.*, 2009; 6: Saraiva *et al.*, 2009; 7: Ferreira *et al.*, 2010

Pode-se observar na Figura III.8 que os espectros de massas representativos dos seis grupos experimentais apresentam como íons mais intensos, os valores de m/z 723,7, 725,7, 754,7, 756,7, 760,7, 780,7, 782,7, 808,7, 810,7, os quais correspondem a fosfocolinas e esfingomielinas. Os TAG aparecem como íons menos intensos, devido à supressão de sua ionização pelas fosfocolinas presentes em grande quantidade na amostra (cinco oócitos em vez de oócito único), mas podem ser observados íons pouco intensos na região de massas de espécies de TAG contendo 50 carbonos (exemplo: m/z 855,9). Dessa maneira, visualmente os espectros são bastante semelhantes, permitindo concluirmos que durante a MIV nas condições de suplementação empregadas neste trabalho, independentemente do suplemento utilizado, não é possível observar variação radical do perfil lipídico de MALDI-MS de oócitos bovinos.

Esse resultado é explicado pelo tipo de lipídeo predominantemente detectado: lipídeos de membrana celular. Durante a MIV ocorrem extensas mudanças metabólicas, mas a síntese de fosfolipídeos correspondentes a membranas de células especializadas só foi observada em fases mais adiantadas do desenvolvimento pré-implantação. O perfil lipídico de oócitos de humanos, ovinos e bovinos analisados individualmente, mostrou-se semelhantes em relação às espécies de fosfolipídeos mais intensas nos espectros (FERREIRA *et al.*, 2010).

Visando avaliar se os íons menos intensos podem ser significativos para a diferenciação os seis grupos experimentais, a análise quimiométrica realizada neste trabalho levou em consideração todos os íons acima da região do ruído (estabelecida como aqueles íons contendo abaixo de 100 *ion counts*) e todos os valores de m/z e suas respectivas intensidades relativas (isto é, valores em porcentagem relativa ao íon mais intenso do espectro, considerado como valor 100%). A análise estatística realizada na publicação de Ferreira *et al.* (2010) levou em consideração apenas os 50 íons mais intensos em cada espectro e somente as espécies com atribuição confirmada foram usadas para a análise quimiométrica. Consideramos que a análise envolvendo todos os dados presentes na amostra, realizada neste trabalho, é mais adequada para indicar as diferenças de perfis lipídicos entre os grupos e podem indicar a influência de íons menos intensos, mas que possam ter uma significação biológica importante.

A Figura III.9 mostra o PCA considerando os dados dos espectros de massas dos seis grupos experimentais, o qual explica 56% da variância dos dados (48,8% no componente principal 1 e 14,2% no componente principal 2). Cada ponto do gráfico corresponde a um espectro de massas (grupo-OVA em azul-claro; grupo SFB em azul-escuro; grupo-BSA em verde; grupo-FE em vermelho; grupo SS em rosa e grupo-K em amarelo). O material suplementar contém os espectros de massas de cada uma das amostras. Embora a densidade de dados no gráfico dificulte a visualização, é possível notar que diversas amostras dos grupos-BSA, FE e K estão distantes em relação do grupo-OVA considerando-se o componente principal 1.

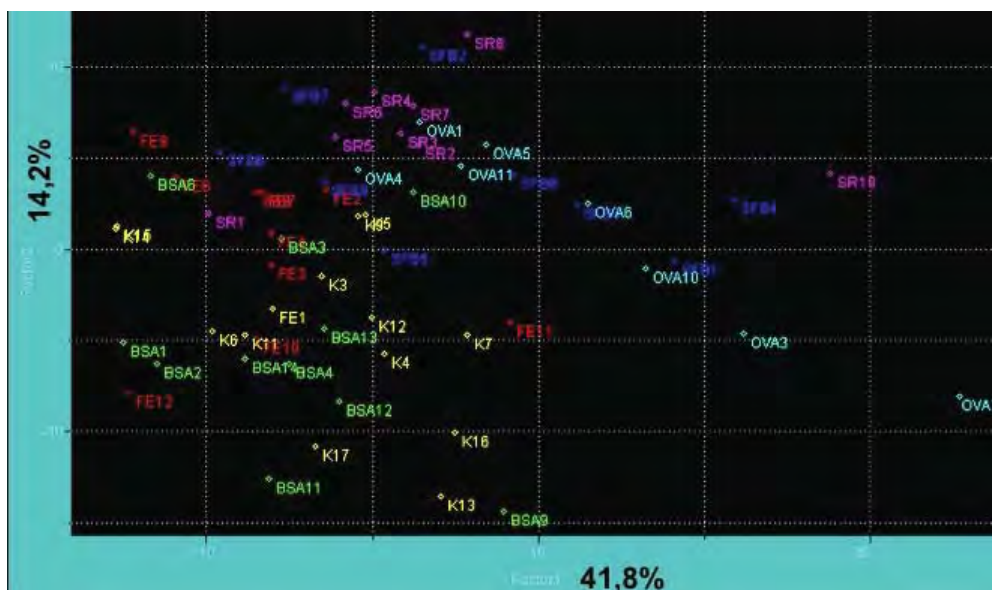


Figura III.9. Gráfico de PCA considerando as amostras dos seis grupos experimentais (grupo-OVA, grupo-SFB, grupo-BSA, grupo-FE, grupo-SS e grupo-K) e indicando a porcentagem da variância explicada pelos componentes principais 1 e 2.

Com o objetivo de caracterizar os valores de m/z responsáveis pelas possíveis diferenças observadas na Figura III.7, foram gerados gráficos de PCA considerando o grupo-OVA em relação ao grupo-BSA (Figura III.8), ao grupo-FE (Figura III.9) e ao grupo K (Figura III.10).

O PCA incluindo os grupos-OVA e BSA (Figura III.8) explicou 65,4% da variância dos dados e pode-se observar que algumas amostras dos grupos OVA e BSA não se diferenciam e relação ao componente principal 1, o qual é o mais significativo. Os valores de m/z sugestivos de estrutura de lipídeos nos valores de *loadings* mais significativos, ou seja, íons de maior variação nas amostras foram os de m/z 790,8, 768,9, 813,9, 774,8 e 729,7, os quais correspondem a íons de baixa intensidade nos espectros das amostras.

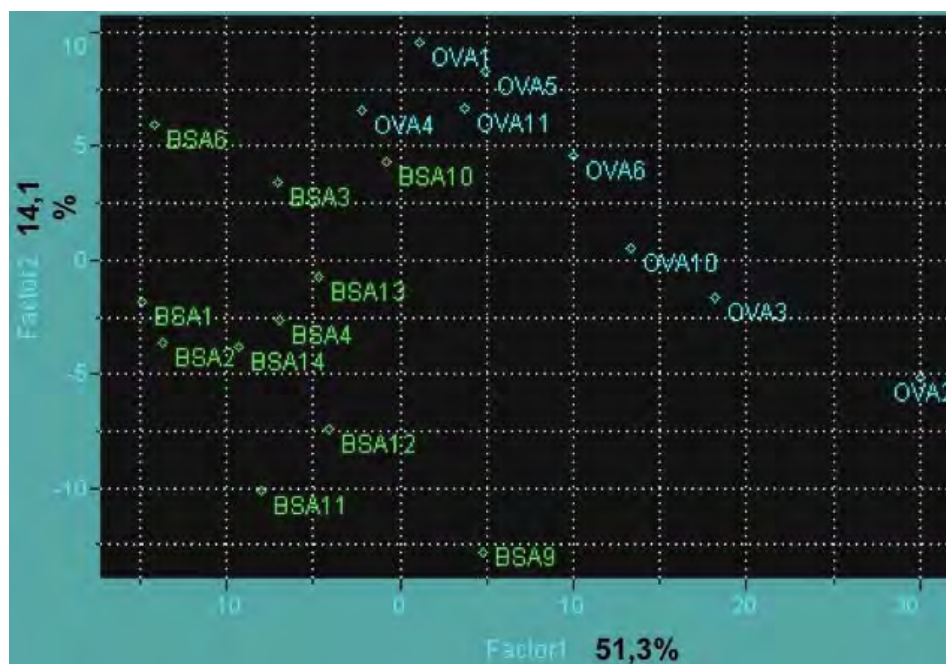


Figura III.10. Gráfico de PCA considerando as amostras dos grupos OVA e BSA, mostrando a porcentagem da variância explicada pelos componentes principais 1 e 2.

O PCA incluindo os grupos-OVA e FE (Figura III.9) explicou 67,0% da variância dos dados. Como na análise anterior, algumas amostras dos grupos OVA e FE não se diferenciam e relação ao componente principal 1, que explica 56,3% da variância dos dados. Os valores de m/z sugestivos de estrutura de lipídeos nos valores de *loadings* mais significativos foram os de m/z 774,9, 786,9, 790,9, 768,9 e 824,4, os quais correspondem a íons de baixa intensidade nos espectros das amostras.

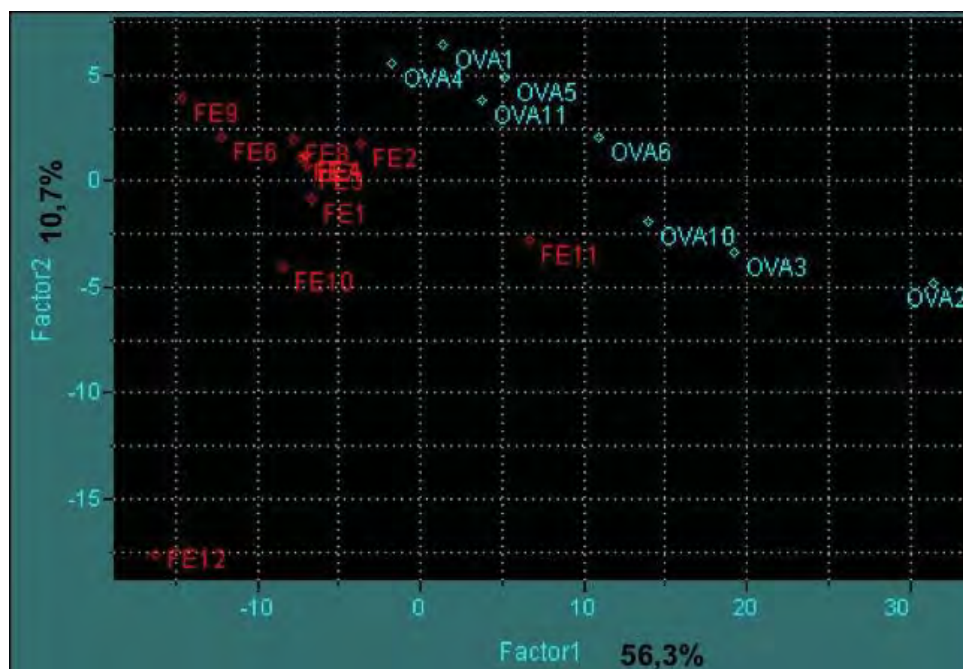


Figura III.11. Gráfico de PCA considerando as amostras dos grupos OVA e FE, mostrando a porcentagem da variância explicada pelos componentes principais 1 e 2.

Em relação à análise por PCA incluindo os grupos-OVA e K (Figura III.10), foi explicado 61% da variância dos dados pelos dois primeiros componentes principais. Continua evidente como algumas amostras dos grupos OVA e K não se diferenciam em relação ao componente principal 1, que explica 47,3% da variância dos dados. Os valores de m/z sugestivos de estrutura de lipídeos nos valores de loadings mais significativos foram os de m/z 786,8, 774,9, 824,9, 769,9, 755,7, todos de baixa intensidade nos espectros das amostras.

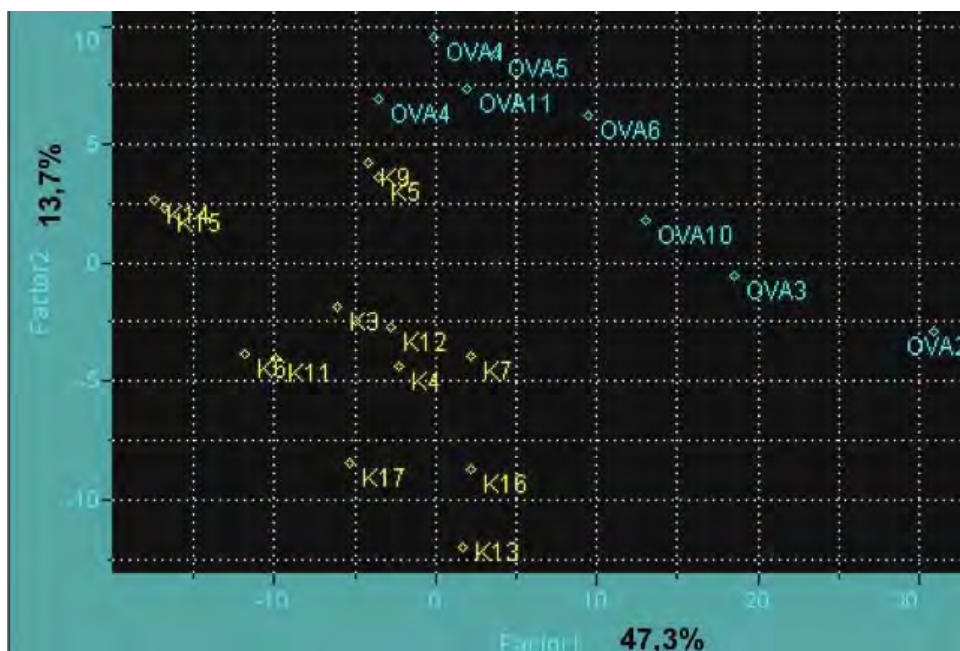


Figura III.12. Gráfico de PCA considerando as amostras dos grupos OVA e K, mostrando a porcentagem da variância explicada pelos componentes principais 1 e 2.

Dessa maneira, em relação à análise do perfil lipídico dos oócitos bovinos maturados com seis diferentes fontes de suplementação no meio, podemos concluir que embora tenha havido certo grau de variação no perfil lipídico de amostras do mesmo grupo e tenha-se observado uma discreta tendência de diferenciação entre os tratamentos pela análise de PCA, não ocorreram extensas variações no perfil de MALDI-MS. Como o perfil de MALDI-MS é dominado por fosfocolinas constituintes de membranas celulares e não existe replicação celular nesta fase, esses resultados são biologicamente sensatos.

Para a análise do perfil lipídico dos embriões produzidos a partir dos tratamentos durante a MIV, foram comparados até o momento os perfis lipídicos de 19 embriões de quatro grupos experimentais: grupo-SFB (N=6), grupo-OVA (N=2), grupo FE (N=7) e grupo SR (N=4). A Figura III.11 mostra um espectro representativo de cada grupo.

Em relação aos espectros de perfil lipídico dos oócitos (Figura III.6), podemos observar como o mesmo altera-se comparando-se oócitos maturados (Figura III.6) e blastocistos (Figura III.11). Observamos aumento da intensidade relativa dos íons de fosfocolinas localizados na região com valores de m/z 732,5 [PC (32:1) + H]⁺, 788,8 [PC (36:1) + H]⁺, 808,8 [PC (38:5) + H]⁺ e/ou [PC (36:2) + Na]⁺, 810,8 [PC (38:4) + H]⁺ e/ou [PC (36:1) + Na]⁺ e de TAG localizados na região de m/z 855,7 PPO (50:1) + Na⁺, 881,7 POO (52:2) + Na⁺ e 909,9 OOS e/ou SSL (54:2) + Na⁺. Os resíduos graxos predominantes na estrutura destas espécies lipídicas [ácido graxo palmítico (16:0), esteárico (18:0), oléico (18:1) e linoléico (18:2)] são os mesmos reportados na literatura, por meio de análises por GC (KHANDOKER *et al.*, 1997, 1998; KHANDOKER e TSUJII, 1999; McEVOY *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2001). A maior complexidade de lipídeos observada em embriões pode estar associada ao aumento da quantidade de membranas celulares ou à especialização das membranas no processo de diferenciação celular, que se inicia na fase de blastocisto. Para avaliar essa hipótese, seria necessário avaliar se existe diferença entre o perfil lipídico da massa celular interna e do trofoblasto.

A análise quimiométrica (Figura III.12) não permite conclusões robustas, uma vez que foram analisados poucos embriões. Notamos variação individual do perfil lipídico, a qual já foi observada (Ferreira *et al.*, 2010) e pode estar ligada à qualidade do embrião ou à origem do oócito (raça, idade da vaca, alimentação), bem como pode estar relacionada à origem dos oócitos. Neste trabalho, a origem dos oócitos não é controlada por serem derivados de ovários de animais abatidos. Serão necessários novos estudos isolando as possíveis variáveis que podem influenciar o perfil lipídico além do processo de PIV avaliado neste trabalho.

Observamos também que não existe um agrupamento claro dos embriões, que pode ser decorrente do pequeno número de amostras analisados em cada grupo ou de maior influência do meio de CIV (foi utilizado o mesmo meio de CIV para os quatro grupos experimentais) do que do meio de MIV no perfil lipídico de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

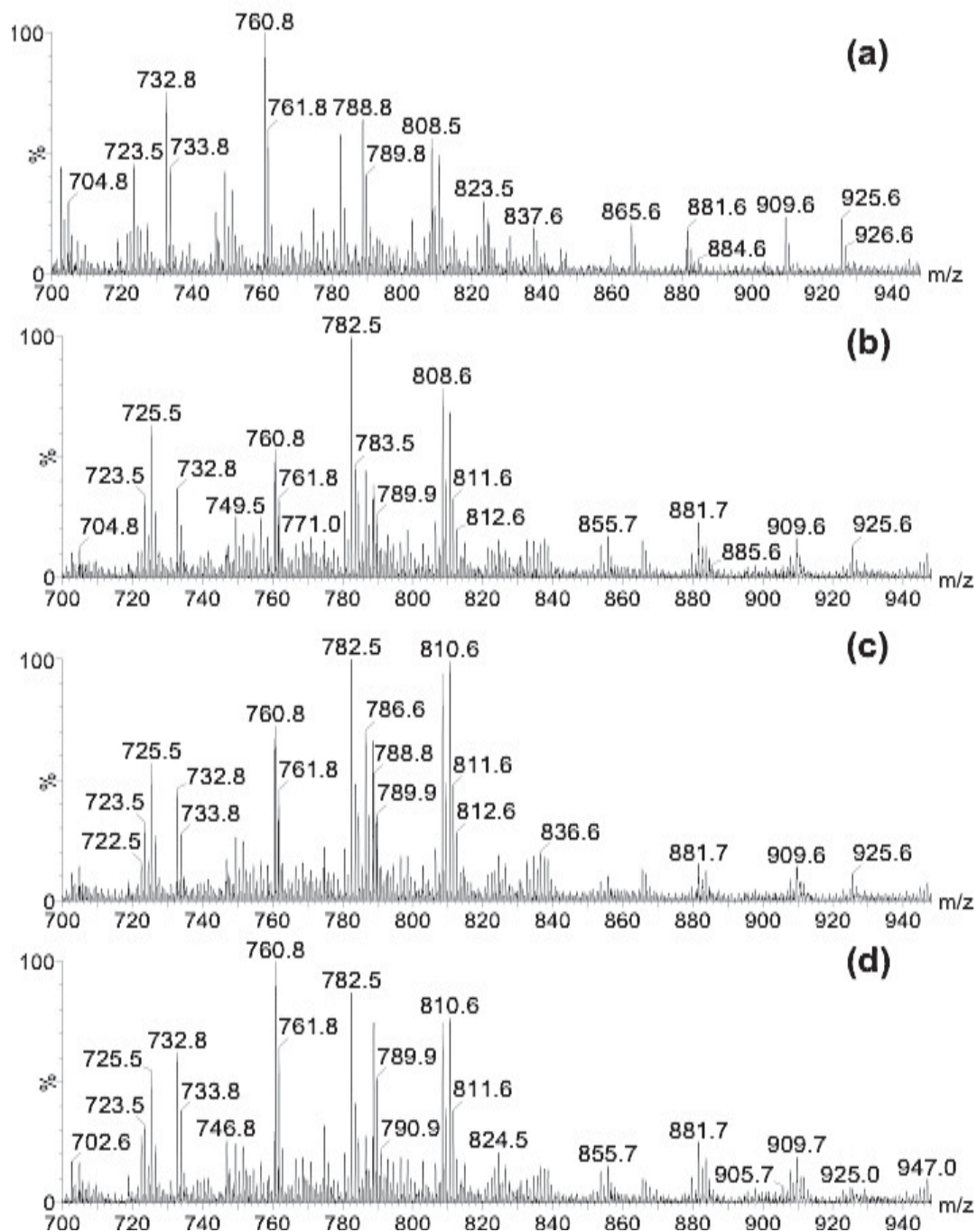


Figura III.13. Espectros de massas de um único blastocisto do grupo suplementado durante a MIV com (a) OVA, (b) SFB, (c) FE e (d) SS.

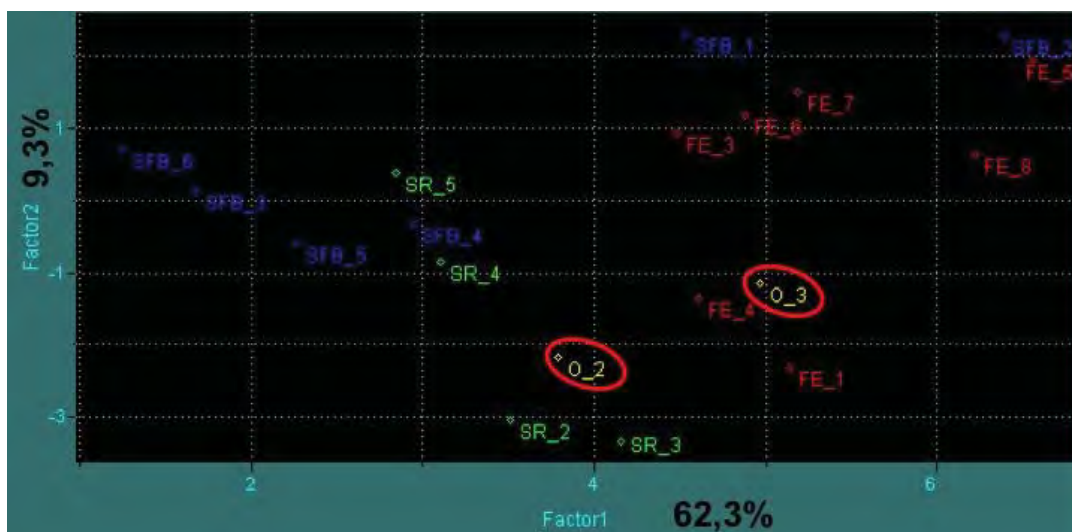


Figura III.14. Gráfico de PCA comparando o perfil lipídico de blastocistos dos grupos OVA (salientados com círculo vermelho), SFB, FE e SS, mostrando a porcentagem da variância explicada pelos componentes principais 1 e 2.

Como o PCA envolvendo todos os embriões (Figura III.12) indicou que o perfil de alguns embriões do grupo-SFB se distanciaram dos embriões grupo-OVA, foi feita a análise isolando-se estes dois grupos (Figura III.13). Dentre os valores de m/z de maior *loading*, estão os lipídeos 703,6, 732,8, 760,8, 732,8, 789,8, 823,8 e 909,7. Pela observação visual, pode-se notar que embora os íons de maior intensidade relativa sejam de mesmos valores de m/z (ou seja, mesmas espécies lipídicas) nos dois perfis [Figura III.11 (a) e (b)], as proporções variam e o perfil do grupo-SFB possui maior variedade de espécies lipídicas, principalmente na região dos TAG (m/z 855,9 a 950,9).

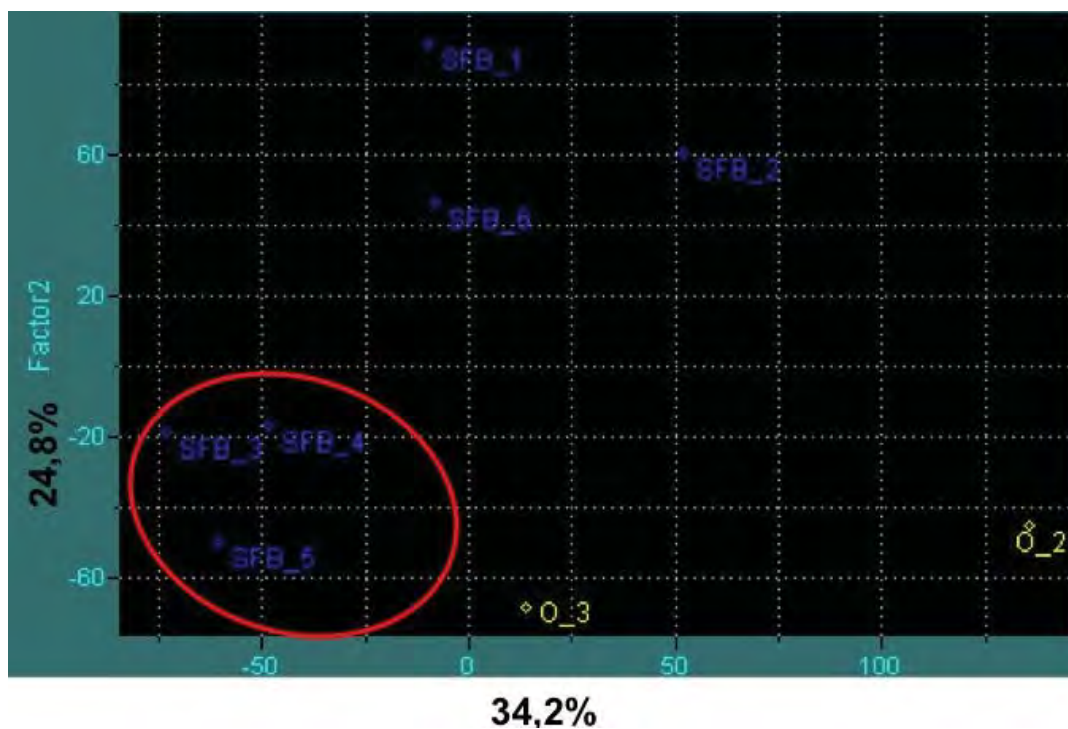


Figura III.15. Gráfico de PCA comparando o perfil lipídico de blastocistos dos grupos OVA e SFB. Os embriões do grupo SFB dentro do círculo vermelho tiveram o perfil com maiores diferenças em relação ao grupo OVA. O Perfil lipídico da amostras indicada como O_2 está mostrado na figura III.11 (a) e o embrião SFB_4 na figura III.11 (b).

6. CONCLUSÕES

Não foi observada alteração significativa do perfil lipídico (representado por fosfolípidos, esfingomielinas e TAG) obtido por MALDI-MS de oócitos bovinos submetidos à MIV com diferentes fontes de suplementação. Esta observação está de acordo com a condição de baixa atividade de síntese de membranas nesse período.

O perfil lipídico de oócitos e embriões bovinos são visualmente distintos, com maior variedade de espécies lipídicas observadas em embriões. Não foram observadas diferenças consistentes entre os perfis lipídicos dos embriões analisados, decorrente provavelmente, do baixo número de amostras analisadas ou até mesmo da menor influência da condição de MIV em relação à condição de CIV, a qual foi semelhante para todos os grupos experimentais.

Maiores estudos envolvendo outros efeitos, de qualidade embrionária e de isolamento de massa celular interna e trofoblasto seriam úteis para o melhor conhecimento destes fatores no perfil lipídico obtido por MALDI-MS.

7. REFERÊNCIAS

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

ABEYDEERA, L.R.; WANG, W.H.; CANTLEY, T.C.; PRATHER, R.S.; DAY, B.N. Presence of b-mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocyst development after *in vitro* fertilization. **Theriogenology**, v.50, p.747-56, 1998.

AGCA, Y.; MONSON, R.L.; NORTHEY, D.L.; MAZNI, O.A.; SCHAEFER, D.M.; RUTLEDGE, J.J. Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos: normal calving, birth weight and gestation lengths. **Theriogenology**, v.50, p.147-162, 1998.

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

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Practice**, v.7, n.3, p.145-173, 1987.

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

ANGUITA, B.; JIMENEZ-MACEDO, A.R.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T.; PARAMIO, M.T. Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepuberal goat oocytes. **Theriogenology**, v.67, p.526-536, 2007.

APPLIED BIOSYSTEMS (Org). **Espectrometria de massas e suas aplicações**. São Paulo: Abi Expert Training Center, 2005. 40 p.

ARRIS, C.E.; BOYLE, F.T.; CALVERT, A.H.; CURTIN, N.J.; ENDICOTT, J.A.; GARMAN, E.F.; GIBSON, A.E.; GOLDING, B.T.; GRANT, S.; GRIFFIN, R.J.; JEWSBURY, P.; JOHNSON, L.N.; LAWRIE, A.M.; NEWELL, D.R.; NOBLE, M.E.M.; EDWARD, A.; SAUSVILLE, E.A.; SCHULTZ, R.; YU, W. Identification of novel purine and pyrimidine cyclin-dependent kinase inhibitors with distinct molecular interactions and tumor cell growth inhibition profiles. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 2797-2804, 2000.

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

AUGUSTIN, R.; POCAR, P.; WRENZYCKI, C.; NIEMANN, H.; FICHER, B. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced *in vitro*. **Reproduction**, v.126, p.91-9, 2003.

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

AVERY, B.; GREVE, T.; RONSHOLT, L.; BOTNER, A. Virus screening of a bovine *in vitro* embryo production system. **Veterinarian Research**, v.132, p.660, 1993.

BADR, H.; BONGIONI, G.; ABDOON, A.S.S.; KANDIL, O.; PUGLISI, R. Gene expression in the *in vitro*-produced preimplantation bovine embryos. **Zygote**. v.15, p.355–367, 2007.

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

BARCROFT, L.C.; OFFENBERG, H.; THOMSEN, P.; WATSON, A.J. Aquaporin proteins in murine trophectoderm mediate trans-epithelial water movements during cavitation. **Developmental Biology**, v. 256, p. 342-354, 2003.

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

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

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

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J.; MEYERS, S.A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.24, p.621-628, 2003.

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

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

BAVISTER, B.D.; ROSE-HELLEKANT, T.A.; PINYOPUMMINTR, T. Development of *in vitro* matured / *in vitro* fertilized bovine embryos into morula and blastocysts in defined culture media. **Theriogenology**, v.37, p.124-146, 1992.

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

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

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

BIELANSKI, A.; LOEWEN, K.S.; DEL CAMPO, M.R.; SIRARD, M.A.; WILLADSEN, S. Isolation of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in association with the *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**, v.40, p.531-38, 1993.

BIELANSKI, A. A review on disease transmission studies in relationship to production of embryos by *in vitro* fertilization and to related new reproductive technologies. **Biotechnologies Advances**, v.15, n.3/4, p.633-656, 1997.

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

BIOGRAPHIES CHEMISTRY. In: Symposium International, Cap.6, 2001.
Disponível em: < <http://www.biology-online.org/dictionary/ovalbumin/albumin> >
Acesso em: 10 Out. 2006.

BLANKSBY, S.J.; MITCHELL, T.W. Advances in Mass Spectrometry for Lipidomics, in: **Annual Review of Analytical Chemistry**, v.3, p.433-465, 2010.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; SIRARD, M.A. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. **Journal of Andrology**, v.18, p 454-460, 1997.

BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; HERMENÉGILDE, T.; BARNES, F.; SIRARD, M.A. Manipulation of follicular developmental to produce developmentally competent bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.66, p.38-43, 2002.

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

BONI, R.; TOSTI, E.; ROVIELLO, S.; DALE, B. Intercellular communication in *in vivo* and *in vitro*-produced bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v.61, n.4, p.1050-1055, 1999.

BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; BRISSON, C.; CARBONEAU, G.; DUROCHER, J. *In vitro* embryo production in the cow; an effective alternative to the conventional embryo production approach. **Theriogenology**, v.51, p.50–70, 1999.

BORGES, J.C. **Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para a criopreservação de sêmen bovino avaliado através de Testes complementares, inseminação artificial e fecundação *in vitro***. 2008. 70f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

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

BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWICK, M.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.

BRACKETT, R.G.; OLHIPANT, G. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.12, p.260-274, 1975.

BRISON, D. R.; SCHULTZ, R. M. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. **Biology of Reproduction**, v.56, p.1088-1096, 1997.

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

BYRNE, A.T.; SOUTHGATE, J.; BRISON, D.R.; LEESE, H.J. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 117, p. 97-105, 1999.

CAMARGO, L.S.A. **Produção *in vitro* de embriões bovinos na Embrapa Gado de Leite. In: Workshop sobre embriões produzidos *in vitro*: Perspectivas de utilização e possíveis impactos na pecuária brasileira**, 2002, Juiz de Fora. Anais... Juiz de Fora: EMBRAPA Gado de Leite, 2002. p.31-36. (Documentos, 88).

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

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

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

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

CARNEIRO, G.F. Biotecnologia da reprodução na espécie caprina: perspectivas atuais. **Rev Bras Reprod Anim**, v.31, p.268-273, 2007.

CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; VAN LANGENDONCK, A.; MERMILLOD, P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Theriogenology**, v.43, p.1115-1128, 1995.

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

CHAPMAN, JR. **Practical organic mass spectrometry: a guide for chemical and biochemical analysis**. NY, EUA, 2. ed. New York: John Wiley, 1993. 330 p.

CHAURRIAUT-MARIANGUE, C.; BEN-ARI, Y. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. **Neuroreport**, v.7, p.61-64, 1995.

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

CHENG, J.; DUTRA, A.; TAKESONO, A.; GARRET-BEAL.; SCHWARTZBERG, P. L. Improved Generation of C57BL/6J Mouse Embryonic Stem Cells in a Defined Serum-Free Media. **Genetic Diseases Research Branch**, v.39, p.100-104, 2004.

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

CHIAN, R.C.; LIM, J.H.; TAN, S.L. State of the art in *in-vitro* oocyte maturation. **Curr Opin Obstet Gynecology**, v.16, p.211-219, 2004.

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

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

COMBELLES, C.M.; RACOWSKY, C.; ALBERTINI, D.F. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in *in-vitro* matured human oocytes. **Human Reproduction**, v.17, p.1006-1016, 2002.

COMPTON, M.M. A biochemical hallmark of apoptosis: Internucleosomal degradation of the genome. **Cancer Metastasis Rev**, v.11, p.105-119, 1992.

CONNORS, S.A.; KANATSU-SHINOHARA, M.; SCHULTZ, R.M.; KOPF, G.S. Involvement of the cytoskeleton in the movement of cortical granules during oocyte maturation, and cortical granule anchoring in mouse eggs. **Developmental Biology**, v.200, p.103–115, 1998.

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

CROISER, A.E.; FARIN, P.W.; DYKSTRA, M.J.; ALEXANDER, J.E.; FRAIN, C.E. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* and *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.64, p.1375–1385, 2001.

CURCIO BR. **Maturação e vitrificação de oócitos eqüinos incubados em meio contendo hormônio do crescimento e fator de crescimento semelhante à insulina-I**. 2005. 65f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Pós-graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

DAMIANI, P.; FISSORE, R.A.; CILELLI, J.B.; LONG, C.R.; BALISE, J.J.; ROBL, J.M.; DUBY, R.T. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.45, p.521-534, 1996.

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

DEBOIS, D.; BRALET, M.P.; LE NAOUR, F.; BRUNELLE, A.; LAPREVOTE, O. In Situ Lipidomic Analysis of Nonalcoholic Fatty Liver by Cluster TOF-SIMS Imaging, **Analytical Chemistry**, v.81, p.2823-2831, 2009.

DEKEL, N.; LEWYSOHN, O.; AYALON, D. Receptor for GnRH is present in rat oocytes. **Endocrinology**, v. 123, p. 1205-1207, 1998.

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

DE MATOS, D.G.; HERRERA, C.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; VAN SOOM, A.; NOGUEIRA, D.; PASQUALINI, R.S. Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine *in*

vitro embryo production. **Molecular Reproduction and Development**, v.62, p.203-9, 2002.

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

DIEZ, C.; HEYMAN, Y.; LEBOURHIS, D.; GUYADER-JOLY, C.; DEGROUARD, J.; RENARD, J.P. Delipidating *in vitro* produced bovine zygotes: effect on further development and consequences for freezability. **Theriogenology**, v.55, p.923–936, 2001.

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

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

DULCIBELLA, T.; DUFFY, P.; REINDOLLAR, R.; SU, B. Changes in the distribution of mouse oocyte cortical granules and ability to undergo the cortical reaction during gonadotropin stimulated meiotic maturation and aging *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v.43, p.870-876, 1990.

DUQUE, P.; GOMEZ, E.; DIAZ, E.; FACAL, N.; HIDALGO, C.; DIEZ, C. Use of two replacements of serum during bovine embryo culture *in vitro*. **Theriogenology**, v.59, p.889–99, 2003.

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

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

EPPIG, J.J.; SCHROEDER, A.C. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilization *in vitro*. **Biology Reproduction**, v.41, p.268-276, 1989.

FABIAN, D.; IL'KOVA, G.; REHAK, P.; CZIKKOVA, S.; BARAN, V.; KOPPEL, J. Inhibitory effect of IGF-I on induced apoptosis in mouse preimplantation embryos cultured *in vitro*. **Theriogenology**, v.61, p.745-755, 2004.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development**, v.42, p.437-442, 1995.

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

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

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

FARIN, P.W.; CROISER, A.E.; FARIN, C.E. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, v.55, p.151–70, 2001.

FENG, X.; LIU, X.; LUO, Q.; LIU, B.F. Mass spectrometry in systems biology: an overview. **Mass Spectrometry Reviews**, v.27, n.6, p.635-660, 2008.

FENN, J.B.; MANN, M.; MENG, C.K.; WONG, S.F.; WHITEHOUSE, C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v.246, p.64-71, 1989.

FERREIRA, E.M; VIREQUE, A.A; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v.71, p.836-848, 2009.

FERREIRA, C.R.; SARAIVA S.A.R.; GARCIA, J.S.; SANVIDO, G.B.; PERECIN, F.; CATHARINO, R. GOZZO, F.C.; SANTOS, L.F.A.; MARTINS JR, H.; BASSO, A. C.; PONTES, J.H.F.; MEIRELLES, F.V.; COLEHO, M.B.; D'ANGELO, M.; EBERLIN, M.N. **Princípios e aplicações da espectrometria de massas em produção animal**. Anais do II Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal – 22 e 23 de junho de 2009. Embrapa Pecuária Sudeste – São Carlos – SP – Brasil, p.109-136, 2009.

FERREIRA, C.R.; SARAIVA, S.A.; CATHARINO, R.R.;GARCIA, J.S.; SANVIDO, G.B.; GOZZO, F.C.; SARTORI, R.; LO TURCO, E.G.; BERTOLLA, R.P.; GUARDIEIRO, M.M.; EBERLIN, M.N. Single oocyte and embryo mass spectrometry. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF MASS SPECTROMETRY, 18., 2009, Bremen, Alemanha. **Proceedings...** Bremen, Alemanha: ISMS, 2009a. (Abstract 498).

FERREIRA, C.R.; SOUZA, G.H.; RICCIO, M.F.; CATHARINO, R.R.; PONTES, J.H.; BASSO, A.C.; JÚNIOR, J.C.; PERECIN, F.; EBERLIN, M.N. Mass spectrometry fingerprinting of media used for *in vitro* production of bovine embryos. **Rapid Communications of Mass Spectrometry**, v.23, n.9, p.1313-1320, 2009b.

FERREIRA, C.R.; SARAIVA, S.A.; CATHARINO, R.R.; GARCIA, J.S.; GOZZO, F.C.; SANVIDO, G.B.; SANTOS, L.F.; LO TURCO, E.G.; PONTES, J.H.; BASSO, A.C.; BERTOLLA, R.P.; SARTORI, R.; GUARDIEIRO, M.M.; PERECIN, F.; MEIRELLES, F.V.; SANGALLI, J.R.; EBERLIN, M.N. Single embryo and oocyte lipid fingerprinting by mass spectrometry. **Journal of Lipid Research**, v.51, p.1218-1227, 2010.

FERREIRA, C.R.; CATHARINO, R.R.; SARAIVA, A.S.; FONSECA, M.F.R.; BASSO, A.C.; PONTES, J.H.F.; ERENO JR, J.C.; EBERLIN, M.M. Perspectivas para aplicação da técnica de espectrometria de massas na caracterização do lipidoma de oócitos e embriões bovinos produzidos in vitro. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, p.549, Suppl.2, 2008.

FEUGANG, J.M.; DE ROOVER, R.; MOENS, A.; LÉONARD, S.; DESSY, F.; DONNAY, I. Addition of β -mercaptoethanol or Trolox® 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.

FIALKOW, L.; CHAN, C.K.; ROTIN, D.; GRINSTEIN, S.; DOWNEY, G.P. Activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in neutrophils. Role of oxidants. **Journal of Biology Chemistry**, v.269, p.31234-31242, 1994.

FIGUEIREDO, J.R.; GONÇALVES, P.B.D.; VISINTIN, J.A. Biotécnicas e reprodução animal: Princípios básicos, importância e desafios das biotécnicas aplicadas à reprodução animal. **Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v.14, n.44, 2008.

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

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

FUCHS, B.; JAKOP, U.; GÖRITZ, F.; HERMES, R.; HILDEBRANDT, T.; SCHILLER, J.; MÜLLER, K. MALDI-TOF "fingerprint" phospholipid mass spectra allow the differentiation between ruminantia and feloideae spermatozoa. **Theriogenology**, v.71, p.568-575, 2009.

FUCHS, B.; SUSS, R.; SCHILLER, J. An update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research. **Progress in Lipid Research**, v.49, p.450-475, 2010.

FUCHS, B.; NIMPTSCH, A.; SUSS, R.; SCHILLER, J. Analysis of brain lipids by directly coupled matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and high-performance thin-layer chromatography. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v.9, p.1227-1236, 2008a.

FUCHS, B.; SCHILLER, J.; SÜSS, R.; ZSCHARNACK, M.; BADER, A.; MÜLLER, P.; SCHÜRENBERG, M.; BECKER, M.; SUCKAU D. Analysis of stem cell lipids by offline HPTLC-MALDI-TOF MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.392, p.849-860, 2008b.

FUCHS, B.; SCHILLER, J.; SÜSS, R.; ZSCHARNACK, M.; BADER, A.; MÜLLER, P.; SCHÜRENBERG, M.; BECKER, M.; SUCKAU, D. Analysis of stem cell lipids by offline HPTLC-MALDI-TOFMS. **Anal Bioanal Chemistry**, v.392, p.849-860, 2008c.

FUCHS, B.; SCHILLER, J. MALDI-TOF MS Analysis of Lipids from Cells, Tissues and Body Fluids. **Subcellular Biochemistry**, v.49, p.541-565, 2008d.

FUJIWAKI, T.; TASAKA, M.; YAMAGUCHI, S. Quantitative evaluation of sphingomyelin and glucosylceramide using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry with sphingosylphosphorylcholine as an internal standard. Practical application to tissues from patients with Niemann-Pick disease types A and C, and Gaucher disease, **Journal Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Science**, v.870, p.170-176, 2008.

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

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

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

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

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

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

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

GASPARRINI, B.; NEGLIA, G.; DI PAOLO, R.; CAMPANILE, G.; ZICARELLI, L. Effect of cysteamine during *in vitro* maturation on buffalo embryo development. **Theriogenology**, v.54, p.1537-42, 2000.

GASPARRINI, B.; SAYOUD, H.; NEGLIA, G.; DE MATOS, D.G.; DONNAY, I.; ZICARELLI, L. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development. **Theriogenology**, v.60, p.943-52, 2003.

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

GILCHRIST, R.B.; LANE, M.; THOMPSON, J.G. Oocyte-secreted factors: regulators of *cumulus* cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, v.14, p.159-177, 2008.

GILES, J.R.; FOOTE, R.H. Effects of gas atmosphere, platelet-derived growth factor and leukemia inhibitory factor on cell numbers of rabbit embryos cultured in a protein-free medium. **Reproduction Nutr. Development**, v.37, p.97-104, 1997.

GLÜCKMANN, M.; PFENNINGER, A.; KRÜGER, R.; THIEROLF, M.; KARAS, M.; HORNEFFER, V.; HILLENKAMP, F.; STRUPAT, K. Mechanisms in MALDI analysis: surface interaction or incorporation of analytes? **International Journal Mass Spectrom.** v.210/211, p.121-132, 2001.

GOLDSBOROUGH, M.D.; TILKINS, M.L.; PRICE, P.J.; LOBO-ALFONSO, J.; MORRISON, J.R.; STEVENS, M.E. Serum-free culture of murine embryonic stem (ES) cells. **Focus**, v.20, p.8-12, 1998.

GOMES, E.; DIEZ, C. Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.58, p.23-37, 2000.

GÓMEZ, E.; RODRIGUEZ, A.; MUÑOZ, M.; CAAMAÑO, J.N.; HIDALGO, C.O.; MORÁN, E.; FACAL, N.; DÍEZ, C. Serum free embryo culture medium improves *in vitro* survival of bovine blastocysts to vitrification. **Theriogenology**, v.69, p.1013-1021, 2008.

GONÇALVES, P.B.; VISINTIN, J.A.; OLIVEIRA, M.A.L.; MONTAGNER, M.M.; COSTA, L.F.S. **Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal**. 1. ed. São Paulo: Varela, 2002. p. 195-226.

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

GONÇALVES, P.B.; BARRETA, M.H.; SANDRI, L.R.; FERREIRA, ANTONIAZZI, A.Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.212-217, 2007.

GOPICHANDRAN, N.; LEESE, H.J. Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophectoderm and blastocoel fluid. **Reproduction**, v.126, p.299-308, 2003.

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

GRASL-KRAUPP, B.; RUTTKAY-NEDECKY, B.; KOUDELKA, H.; BUKOWSKA, K.; BURSH, W.; SCHULTE-HERMANN, R. In situ detection of fragment DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. **Hepatology**, v.21, p.1465-1468, 1995.

GROSS, J.H. **Mass Spectrometry – A Textbook**. Berlin: Springer, 2004.

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

GUIXUE Z, LUCIANO AM, COENEN K. The influence of cAMP before or during bovine oocyte maturation on embryonic developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, p. 1733-1743, 2001.

GURR, M.I.; HARWOOD, J.L.; FRAYN, K.N. **Lipid Biochemistry an introduction**, 5th ed., Blackwell Science, 2002.

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

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

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

HANSEN, P.J.; BLOCK, J. Towards an embryocentric world: the current and potential uses of embryo technologies in dairy production. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.1–14, 2004.

HARDY, K.; HANDYSIDE, A.H.; WINSTON, R.M.L. The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development *in vitro*. **Development**, v.107, p. 597-604, 1989.

HARDY, K. Apoptosis in the human embryo. . **Reviews of Reproduction**, v. 4, p. 125-134, 1999.

HARDY, K.; WRIGHT, C.S.; FRANKS, S.; WINSTON, R.M.L. *In vitro* maturation of oocytes. **Br Med Bull**, v.56, p.588-602, 2000.

HARVEY, M.B.; KAYE, P.L. Insulin increases the cell number of inner cell mass and stimulates morphological development of mouse blastocyst *in vitro*. **Development**, v.110, p.963-967, 1990.

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

HASLER, J.F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.79, p.245-264, 2003.

HASLER, J.F. The current status of oocytes recovery, *in vitro* embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with an emphasis on the bovine. **Journal of Animal Science**, v.76, p.52–74, 1998.

HAVLICEK, V.; KUZMANY, A.; CSEH, S.; BREM, G.; BESENFELDER, U. The effect of long-term *in vivo* culture in bovine oviduct and uterus on the development and cryo-tolerance of *in vitro* produced bovine embryos. **Reproduction Domestic Animals**, In press (DOI: 10.1111/j.1439-0531.2009.01364.x), 2009.

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

HOFFMANN, E.; STROOTBART, V. **Mass spectrometry**: principles and applications. 3. Ed. West Sussex, England: Wiley-Interscience, 2007. 502 p.

HOLM, P.; BOOTH, P.J.; SCHMIDT, M.H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaaci medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum proteins. **Theriogenology**, v.52, p.683-700, 1999.

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

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

HOST, E.; LINDENBERG, S.; SMIDT-JENSEN, S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v.79, p.559-563, 2000.

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

HUGHES, C.M.; LEWIS, S.E.M.; MCKELVEY-MARTIN, V.J.; THOMPSON, W. A comparison of baseline and induced DNA damage in human sperm from fertile and infertile man, using a modified comet assay. **Molecular Human Reproduction**, v.2, p.613-619, 1996.

HUGHES, C.M.; LEWIS, S.E.M.; MCKELVEY-MARTIN, V.J.; THOMPSON, W. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. **Human Reproduction**, v.13, p.1240-1247, 1998.

IETS. **Manual of International Embryo Transfer Society**. Ed. Stringfellow, D.A. e Seidel, S.M.; 3^a ed., 1998, p.167-170, Appendix D.

International Embryo Transfer Society (IETS). In: STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M.; editors. **Manual of the international embryo transfer society: a procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology, emphasizing sanitary procedures**. 3rd ed., Savoy, I.L.: IETS, 1998

IMAI, H.; NAGAI, T.; KOBAYASHI, S.; TSUJINO, T.; KOJIMA, T. Effects of butirolactone I on GVBD in bovine oocytes and their subsequent maturation, fertilization and development *in vitro*. **Theriogenology**, v. 51, pp. 377, 1999 (abstract).

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

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

JORNAL "O EMBRIÃO". **SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES**. Ano X, edição 37, p.17-19, 2008.

JURISICOVA, A.; ROGERS, I.; FASCIANI, A.; CASPER, R.F.; VARMUZA, S. Effects of maternal age and conditions of fertilization on programmed cell death during murine preimplantation development. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, p. 139-145, 1995.

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

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

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

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

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

KARAS, M.; BACHMANN, D.; BAHR, U.; HILLENKAMP, F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. **International Journal Mass Spectrom. Ion Proc.**, v.78, p.53-68, 1987.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical Chemistry**, v.60, p.2299-2301, 1988.

KATES, M. **Techniques in Lipology: Isolation, analysis and identification of Lipids**, Elsevier, New York, 1986.

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, p.333-339, 1996.

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

KHANDOKER, M.A.M.Y.; TSUJII, H. Effect of exogenous fatty acids on *in vitro* development of rat embryos. **Asian-Australian Journal of Animal Science**, v.12, p.169, 1999.

KHANDOKER, M.A.M.Y.; TSUJII, H.; KARASAWA, D. Fatty acid compositions of oocytes, follicular oviductal and uterine fluids of pig and cow. **Asian-Australian Journal of Animal Science**, v.10, p.523, 1997.

KHANDOKER, M.A.M.Y.; TSUJII, H.; KARASAWA, D. A kinetics of fatty acid composition of embryos, oviductal and uterine fluids in the rabbit. **Asian-Australian Journal of Animal Science**, v.11, p.60, 1998.

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

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

KIM, J.Y.; KNOSHITA, M.; OHNISHI, M.; FUKUI, Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and *in vitro* matured bovine oocytes. **Reproduction**, v.122, p.131-138, 2001.

KIM, B.K.; ANOWER JABED, M.; KANG, S.R.; KIM, D.; CHANG-HEE HAN, HUH, M.K.; KAMAL, T. Effects of spermatozoa during *in vitro* meiosis progression in the porcine germinal vesicle oocytes. **Animal Reproduction of Science**, v.104, p.83-92, 2008.

KNIJN, H.M.; GJORRET, J.O.; VOS, P.L.; HENDRIKSEN, P.J.; VAN DER WEIJDEN, B.C.; MADDOX-HYTTEL, P.; DIELEMAN, S.J. Consequences of *in vitro* development

and subsequent culture on apoptosis, cell number, and blastocyst formation in bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1371-1378, 2003.

KNOCHENMUSS, R. Ion formation mechanisms in UV-MALDI. **Analyst**, v.131, p.966-986, 2006.

KODAMA, H.; YAMAGUCHI, R.; FUKUDA, J.; KASAI, H.; TANAKA, T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. **Fertility and Sterility**, v.68, p.519-524, 1999.

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

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

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

KRISHER, R.L. The effect of oocyte quality on development. **Journal of Animal Science**, v.82, p.45-51, 2004.

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

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

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

LAZZARI, G.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; DUCHI, R.; KRUIP, T.; NIEMANN, H. Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro*-produced embryos are related to the large offspring syndrome. **Biology of Reproduction**, v.67, p.767-775, 2002.

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

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

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

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

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

LEIBO, S.P.; LOSKUTOFF, N.M. Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. **Theriogenology**, v.39, p.81-94, 1993.

LEIVAS, F.G. **Influência da atmosfera gasosa e da fonte protéica sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro* e taxa de prenhez em bovinos**. 2006 80f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Fisiopatologia da Reprodução) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

LEWIS, A.M.; KAYE, P.L.; LISING, R.; CAMERON, R.A. Stimulation of protein synthesis and expansion of pig blastocysts by insulin *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, v.4, p.119-23, 1992.

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

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

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

LIM, J.M.; HANSEL, W. Exogenous substances affecting development of *in vitro* derived bovine embryos before and after embryonic genome activation. **Theriogenology**, v.53, p.1081-91, 2000.

LIM, K.T.; JANG, G.; KO, K.H.; LEE, W.W.; PARK, H.J.; KIM, J.J.; LEE, S.H.; HWANG, W.S.; LEE, B.C.; KANG, S.K. Improved *in vitro* bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. **Theriogenology**, v.67, p.293-302, 2007.

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

LIU, Z.; FOOTE, R.H. Effects of amino acids on the development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilization bovine embryos in a simple protein free medium. **Human Reproduction**, v.10, n.11, p.2985-2991, 1995.

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

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

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

LONERGAN, P.; DINNYES, A.; FAIR, T.; YANG, X.; BOLAND, M. Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butirolactone I. **Molecular Reproduction and Development**, v. 57, p. 204-209, 2000.

LONERGAN, P.; RIZOS, D, GUTIERREZ-ADAN, A, MOREIRA, P.M.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage *in vitro* or *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1424–1431, 2003.

LONERGAN, P.; PEDERSEN, H.G.; RIZOS, D.; GREVE, T.; THOMSEN, P.D.; FAIR, T. Effect of the post-fertilization culture environment on the incidence of chromosome aberrations in bovine blastocysts. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1096–100, 2004.

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

LO TURCO, E. G. **Maturação nuclear e padrões de apoptose em oócitos bovinos na presença de células do cumulus em meio suplementado com diversas fontes de macromoléculas**. 2004. 78 f. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária – Reprodução animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária “Julio de Mesquita Filho” Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

LUCHIARI FILHO, A. **Produção de carne bovina no Brasil, qualidade, quantidade ou ambas?** In: SIMBOI. Simpósio sobre Desafios e Novas Tecnologias na Bovinocultura de Corte, 2, 2006, Brasília, DF. Brasília, DF: SIMBO 2006.

MAPELLI, M.; MASSIMILIANO, L.; ROVACE, C.; SEELIGER, M.A.; TSAI, L-H.; MEIJER, L.; MUSACCHIO, A. Mechanism of CDK5/P25 Binding by CDK Inhibitors. **Journal Medicine Chemistry**, v.48, p.671-679, 2005.

MATSUI, M.; TAKAHASHI, Y.; HISHINUMA, M. et al. Stimulatory effects of insulin on the development of bovine embryos fertilized *in vitro*. **J. Vet. Med. Sci.**, v.57, p.331-336, 1995.

McEVOY, T.G.; COULL, G.D.; BROADBENT, P.J.; HUTCHINSON, J.S.M.; SPEAKE, B.K. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.118, p.163-170, 2000.

MCGOWAN, K.M.; LONG, S.D.; PEKALA, P.H. Glucose transporter gene expression: regulation of transcription and mRNA stability. **Pharmacology and Therapeutics**, v.66, p.465-505, 1995.

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

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

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

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

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

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

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

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

MINGOTI, G.Z. Aspectos técnicos da produção *in vitro* de embriões bovinos. In: Simpósio **Tópicos Avançados em Biotecnologias da Reprodução**, 1, 2005, Jaboticabal: Jaboticabal, SP: UNESP, 2005.

MONACO, E.; GASPARRINI, B.; BOCCIA, L.; DE ROSA, A.; ATTANASIO, L.; ZICARELLI, L.; KILLIAN, G. Effect of osteopontin (OPN) on *in vitro* embryo development in cattle. **Theriogenology**, 2008.

MOOR RM, KRUIP TAM, GREEN D. Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation. **Theriogenology**, v.21, p.103-106, 1984.

MOORE, K.; RODRÍGUEZ-SALLABERRY, C.J.; KRAMER, J.M.; JOHNSON, S.; WROCLAWSKA, E.; GOICOA, S.; NIASARI-NASLAJI, A. *In vitro* production of bovine embryos in medium supplement with a serum replacer: Effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. **Theriogenology**, v.68, p.1316–1325, 2007.

MORATO, R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M.T.; MOGAS, T. Embryo development and structural analysis of *in vitro* matured bovine oocytes vitrified in flexipet denuding pipettes. **Theriogenology**, 2008.

MORRIS, I.D.; ILOTT, S.; DIXON, L.; BRISON, D.R. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. **Human Reproduction**, v.17, p.990-998, 2002.

MOTLIK, J.; PAVLOK, A.; KUBELKA, M.; KALOUS, J.; KALAB, P. Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocyte. **Theriogenology**, v. 49, p. 461-469, 1998.

MOZZAQUATRO, F.D.; TESSMANN, J.V.; PILLA, L.F.C.; SILVA, D.S.; BUNN, S. **Produção *in vitro* de embriões bovinos com fontes protéicas definidas e indefinidas**. In: V Reunião Anual da SBTE, 2003 Anais..., Beberibe – CE, 2003, p.496-497.

NEDAMBALE, T.L.; DINNYES, A.; GROENC, W.; DOBRINSKY, J.R.; TIAN, X.C.; YANG, X. Comparison on *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in KSOM and SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v.62, p.437-49, 2004.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4th edition, Ed. Freeman, p.343, 2005.

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

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

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

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

OYAMADA, T.; IWAYAMA, H.; FUKUI, Y. Additional effect of epidermal growth factor during in vitro maturation for individual bovine oocytes using a chemically defined medium. **Zygote**, v.12, p.143–50, 2004.

PALASZ, A.T.; MAPLETOFT, R.J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. **Biotechnology Advances**, v.14, p.127-149, 1995.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, n.2, p.209-222, 1992.

PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Heat shock- induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**, v.66, p.1169-77, 2002.

PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v.31, p.63-67, 1992.

PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.; PORTUGAL, P.V.; BESSA, R.J.; SILVA, J.C.; PEREIRA, M.S.; MARQUES, C.C. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA). **Animal Reproduction of Science**, v.98, p.293-301, 2007.

PEREIRA, R.M.; CARVALHAIS, I.; PIMENTA, J.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.; SANTOS, I.C.; MARQUES, M.R.; REIS, A.; PEREIRA, M.S.; MARQUES, C.C. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. **Animal Reproduction of Science**, v.106, p.322-332, 2008.

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

PICTON, H.M.; HARRIS, S.E.; MURUVI, W.; CHAMBERS, E.L. The in vitro growth and maturation of follicles. **Reproduction**, v.136, p.703-715, 2008.

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

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

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

PONTES, J.H.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO, S.; BARREIROS, T.R.; OLIVEIRA, J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA, M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v.71, p.690-697, 2009.

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

RACHID, M.A. **Apoptose**. Disponível em: <http://www.icb.ufmg.br/pat/apopt.htm>. Acesso em 17 de novembro de 2010, 2002.

REIS, A.; ROOKE, J.A.; MCCALLUM, G.J.; STAINES, M.E.; EWEN, M.; LOMAX, M.A. Consequences of exposure to serum, with or without vitamin E supplementation, in terms of the fatty acid content and viability of bovine blastocysts produced in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, v.15, p.275–84, 2003.

RILEY, J.K.; MOLEY, K.H. Glucose utilization and the PI3-K pathway: mechanisms for cell survival in preimplantation embryos. **Reproduction**, v.131, p.823-835, 2006.

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

RIZOS, D.; FAIR, T.; PAPADOPOULOS, S.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v.62, p.320-327, 2002.

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biology of Reproduction**, v.68, p.236–43, 2003.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction Development**, v.61, p.234–248, 2002.

RODRIGUEZ-SALLABERRY, C. J.; KRAMER, J.; MOORE, K. Development of *in vitro* produced bovine embryos cultured in media supplemented with a Serum Replacer. **Annual Meeting SSR**, p.124, 2002.

RUSSEL, D.F.; BAGIR, S.; BORDIGNON, J.; BETTS, D.H. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. **Molecular Reproduction Development**, v.73, p.1255-1270, 2006.

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

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

SAGIRKAYA, H.; MISIRLIOGLU, M.; KAYA, A.; FIRST, N.L.; PARRISH, J.J.; MEMILI, E. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. **Animal Reproduction Science**, v.101, p.225-40, 2007.

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

SANTOS, F.; ZAKHARTCHENKO, V.; STOJKOVIC, M.; PETERS, A.; JENUWEIN, T.; WOLF, E.; REIK, W.; DEAN, W. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. **Current Biology**, v.13, n.13, p. 1116-1121, 2003.

SANTOS, R.R.; VAN DEN HURK, R.; RODRIGUES, A.P.R.; COSTA, S.H.F.; MARTINS, F.S.; MATOS, M.H.T.; CELESTINO, J.J.H.; FIGUEIREDO, J.R. Effect of cryopreservation, activation and growth of *in situ* and isolated ovine early-stage follicles. **Animal Reproduction Science**, v.99, p.53-64, 2007.

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

SCHILLER, J.; SUSS, R.; FUCHS, B.; MULLER, M.; ZSCHORNIG, O.; ARNOLD, K. MALDI-TOF MS in lipidomics. **Frontiers in Bioscience**, v.12, p.2568-2579, 2007.

SCHILLER, J.; SÜSS, R.; ARNHOLD, J.; FUCHS, B.; LESSIG, J.; MÜLLER, M.; PETKOVIĆ, M.; SPALTEHOLZ, H.; ZSCHÖRNIG, O.; ARNOLD, K. Matrix-assisted

laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. **Prog Lipid Research**, v.43, p.449-488, 2004.

SEIDEL JR, G.E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.228–235, 2006.

SENEDA, M.M., ESPER, C. R., GARCIA, J.M., ANDRADE, E.R. Aspectos técnicos e biológicos da obtenção de oócitos bovinos: revisão de literatura. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.23, p.101-110, 2002.

SERAPIÃO, R.V.; RAMOS, A.A.; POLISSENI, J. et al. Efeito de sistemas de cultivo definido e semi-definido no desenvolvimento de blastocistos bovinos. In: XXIX Semana de Biologia e XII Mostra de Produção Científica, 2006, Juiz de Fora-MG. **Universidade Federal de Juiz de Fora**, p.66-69.

SERAPIÃO, R.V.; RAMOS, A.A.; POLISSENI, J. et al. Embriões bovinos produzidos *in vitro* cultivados em meio CR2 suplementado com Knockout SR. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.408, 2005.

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

SHAMSUDDIN, M., LARSSON, B., GUSTAFFSON, H., GUSTARI, S., BARTOLOME, J., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Comparative morphological evaluation of *in vitro* and *in vivo* produced embryos. **International Congress on Animal Reproduction**, v.3, p.1333-1335, 1992.

SHARMA GT, MAJUMDAR AC, BONDE SW. Chronology of maturational events in goat oocytes cultured *in vitro*. **Small Ruminant Research**, v.22, p.25-30, 1996.

SHARMA, R.K.; SEIFARTH, K.; AGRAWAL, A. Comparison os single- and two-layer Percoll separation for selection of mobile spermatozoa. **International Journal Fertility and Womens Medicine**, v.42, p.412-417, 1997.

SILVA, D.S. **Cultivo de embriões bovinos produzidos in vitro em álcoolpolivinílico (PVA)**. 2005. 113f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Reprodução Animal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

SIQUEIRA FILHO. **Pressão hidrostática: efeito na vitrificação, ultraestrutura e expressão gênica de embriões bovinos**. 2009. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

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

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

SIRARD, M.A.; BLONDIN, P. oocyte maturation and IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**. v.42, p.417-426, 1996.

SIRISATHIEN, S.; HERNANDEZ-FONSECA, H.J.; BOSCH, P.; HOLLET, B.R.; LOTT, J.D.; BRACKETT, B.G. Effect of leukemia inhibitory factor on bovine embryos produced *in vitro* under chemically defined conditions. **Theriogenology**, v.59, p.1751–63, 2003.

SIUZDAK, G. **The expanding role of mass spectrometry in biotechnology**. 2nd edition, MCC Press, San Diego-EUA. 257p., 2006.

SMITH, R.M.; GARSIDE, W.T.; AGHAYAN, M.; SHI, C.Z.; SHAH, N.; JARETT, L.; HEYNER, S. Mouse preimplantation embryos exhibit receptormediated binding and transcytosis of maternal insulin-like growth factor I. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1-12, 1993.

SMITZ, J.E.J.; NOGUEIRA, D.; VANHOUTTE; MATOS, D.G; CORTVRINDT, R.N. Oocyte: *in vitro* maturation. In: Suh CS, Sonntag B, Erickson GF. The ovarian life cycle: a contemporary view. **Rev Endocr Metab Disord**, v.3, p.5-12, 2004.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Organic Chemistry**. John Wiley & Sons Inc., Eight Edition, Cap. 23, 2004.

SOMFAI T, KIKUCHI K, MEDVEDEV S, ONISHI A, IWAMOTO M, FUCHIMOTO D, OZAWA M, NOGUCHI J, KANEKO H, OHNUMA K, SATO E, NAGAI T. Development to the blastocyst stage of immature pig oocytes arrested before the metaphase-II stage and fertilized *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.90, p.307-328, 2005.

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

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

STEPTOE, P.C.; EDWARD, R.G. Birth after reimplantation of human embryo. **Lancet**, v.2, p.366, 1978.

STRINGFELLOW, D.A.; RIDELL, K.P.; BROCK, K.V.; RIDELL, M.G.; GALIK, P.K.; WRIGHT, J.C. HASLER, J.F. *In vitro* fertilization and *in vitro* culture of bovine embryos in the presence of noncytopathic bovine viral diarrheavirus. **Theriogenology**, v.48, p.171-183, 1997.

STRINGFELLOW, D.A.; WRATHALL, A.E. Epidemiological implications of the production and transfer of IVF embryos. **Theriogenology**, v.43, p.89–96, 1995.

STRINGFELLOW, D.A.; GIVENS, M.D.; WALDROP, J.G. Biosecurity issues associated with current and emerging embryo technologies. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.93-102, 2004.

STURMEY, R.G.; HAWKHEAD, J.A.; BARKER, E.A.; LEESE, H.J. DNA damage and metabolic activity in the preimplantation embryo. **Human Reproduction**, p.1-11, 2008.

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

SUN, X.F.; WANG, W.H.; KEEFE, D.L. Overheating is detrimental to meiotic spindles within in vitro matured human oocytes. **Zygote**, v.12, p.65-70, 2004.

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

TANAKA, K.; WAKI, H.; IDO, Y.; AKITA, S.; YOSHIDA, Y.; YOSHIDA, T. Protein and polymer analysis up to m/z 100.000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Comm. Mass Spectrom.**, v.2, p.151-153, 1988.

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

TAKAHASHI, Y.; FIRST, N. L. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. **Theriogenology**, v.37, p.963-978, 1992.

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

TARIN, J.J.; TROUNSON, A.A. Effects of stimulation and inhibition of lipid peroxidation on freezing-thawing of mouse embryos. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1362-68, 1993.

TETZNER, T.A.D. **Efeitos da substituição do soro fetal bovino (SFB) e da albumina sérica bovina (BSA) pela ovalbumina (OVA) na produção *in vitro* de embriões bovinos**. 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária – Reprodução animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, "Julio de Mesquita Filho" Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

THIBIER, M. **Data Retrieval Committee Annual Report**. IETS Embryo Transfer Newsletter 2006; v.24, p.12-18, 2006.

THIBIER, M. A contrasted year for the world activity of the animal embryo transfer industry: a report from the IETS data retrieval committee. **International Embryo**

Transfer Society Newsletter, v.20 (4), p.13-19, 2002.

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

THIBIER, M. International Embryo Transfer Society: Data Retrieval Committee Annual Report. **Embryo Transfer Newsletter**, n.25, p.15-20, 2007.

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

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

THOMPSON, J.G.; Comparison between *in vivo*-derived and *in vitro*-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.9, p.354–431, 1997.

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

TILLY, J.L. Apoptosis and ovarian function. **Reproduction**, v.1, p.162-172, 1996.

TOMINAGA, K. Cryopreservation and sexing of *in vivo* and *in vitro*-produced embryos for their practical use. **Journal of Reproduction and Development**, v.50, p.29-38, 2004.

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

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

USHIJIMA, H. Application study of developmental engineering for livestock production. **Journal Reproduction Development**, v.51, n.1, p.15-22, 2005.

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

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P.J.; JACOBSON, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, p.53-58, 1998.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717-1751, 2005.

VANHOUTTE, L.; SUTTER, P.; NOGUEIRA, D.; GERRIS, J.; DHONT, M.; VAN DER ELST, J. Nuclear and cytoplasmic maturation of *in vitro* matured human oocytes after temporary nuclear arrest by phosphodiesterase 3-inhibitor. **Human Reproduction**, v.22, p.1239-1246, 2007.

VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; SOOM, A. V. Structural aspects of zona pellucida of *in vitro*-produced bovine embryos: a scanning electron and confocal laser scanning microscopic study. **Biology of Reproduction**, v.62, p.463-469, 2000.

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

VAN SOOM, A.; MAHMOUDZADEH, A.R.; DE KRUIF, A. Timing of blastocyst formation and cell number of early blastocysts derived from *in vitro* techniques. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.12, p.117, 1993.

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

VAN SOOM, A., VAN VLAENDEREN, I., MAHMOUDZADEH, A.R., DELUYKER, H., KRUIF, A. Compaction rate of *in vitro* fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. **Theriogenology**, v.38, p.905-919, 1992.

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

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

VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.32, p.100-109, 2008.

VELILLA, E.; IZQUIERDO, D.; RODRIGUEZ-GONZALEZ, E.; LOPEZ-BEJAR, M.; VIDAL, F.; PARAMIO, M.T. Distribution of prepubertal and adult goat oocyte cortical granules during meiotic maturation and fertilization: ultrastructural and

cytochemical study. **Molecular Reproduction and Development**, v.68, p.507-514, 2004.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. Bovine embryo production in Brazil: a new cenario. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.3, p.920-924, 2007.

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

WALKER, S.K.; HEARD, T.M.; SEAMARK, R.F. *In vitro* culture of sheep embryos without co-culture of sheep embryos without co-culture: success and perspectives. **Theriogenology**, v.37, p.111-126, 1992.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction and Fertility Development**, v.7, n.4, p.871, 891, 1995.

WATSON, P.F.; BARCROFT, L.C. Regulation of blastocyst formation. **Front Bioscience**, v.6, p.708-730, 2001.

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

WATSON, A.J.; NATALE, D.R.; BARCROFT, L.C. Molecular regulation of blastocyst formation. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.583-592, 2004.

WEBER, P. K.; YOUNGS, C. R. Investigation of cryoprotectant toxicity to porcine embryos. **Theriogenology**, v.41, p.1291-1298, 1994.

WESSEL, G.M.; BROOKS, J.M.; GREEN, E.; HALEY, S.; VORONINA, E.; WONG, J.; ZAYDFUDIM, V.; CONNER, S. **The Biology of Cortical Granules**. Department of Molecular Biology, Cell Biology & Biochemistry. Brown University. Providence, Rhode Island, 02912. 2001. 90p.

WILLIS P, CAUDLE AB, FAYRER-HOSKEN RA. Equine oocyte *in vitro* maturation: influence of sera, time and hormones. **Molecular, Reproduction and Development**, v.30, p.360-368, 1991.

WILMUT, I.; ROWSON, L.E.A. Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. **The Veterinary Record**, v.92, p.682-690, 1973.

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

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

WRATHALL, A. Embryo transfer and disease transmission in livestock: a review of recent research. **Theriogenology**, v.43, p.81-88, 1995.

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

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. **Reproduction, Fertility and Development**, v.17, p.23–35, 2005.

WRIGHT JR, R.W.; ELLINGTON, J. Morphological and physiological differences between *in vivo* and *in vitro* produced preimplantation embryos from livestock species. **Theriogenology**, v.44, p.1167-1189, 1995.

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

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

YUAN, Y.Q. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. **Theriogenology**, v.59, p.1585-1596, 2003.

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

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