

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

**VIABILIDADE DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES OVINOS EM
MEIO DE MATURAÇÃO SUPLEMENTADO COM SORO FETAL
BOVINO (SFB) OU ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA) ACRESCIDO
OU NÃO DE CISTEAMINA**

GIOVANA D'ANDRÉA PAVÃO

Botucatu-SP

Janeiro 2009

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

**VIABILIDADE DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES OVINOS EM
MEIO DE MATURAÇÃO SUPLEMENTADO COM SORO FETAL
BOVINO (SFB) OU ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA) ACRESCIDO
OU NÃO DE CISTEAMINA**

GIOVANA D'ANDRÉA PAVÃO

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

Orientadora: Profa. Dra Eunice Oba

Botucatu-SP

Janeiro 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Pavão, Giovana D'Andrea.

Viabilidade da produção *in vitro* de embriões ovinos em meio de maturação suplementado com soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA) acrescido ou não de cisteamina/ Giovana D'Andrea Pavão. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2009.

Orientador: Profª. Drª. Eunice Oba

Assunto CAPES: 50500007

1. Fertilização *in vitro*. 2. Ovino - Reprodução. 3. Ovócitos.

CDD 636.208245

Palavras chave: Embriões; Ovócitos; Ovino; Produção *in vitro*.

Composição da Banca Examinadora

Profa Eunice Oba

Profa Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Prof. Wilter Ricardo Russiano Vicente

.....

DEDICATÓRIA

À Deus

Aos meus queridos pais, José Antonio G.R. Pavão e Sonia Marina D' Andréa Pavão, por todo apoio incondicional, companheirismo, amor e incentivo em mais esta conquista.

À minha irmã Alessandra D' Andréa Pavão que sempre demonstrou presente em todos os meus passos

Ao meu cunhado Leonardo Bellot pelo acompanhamento de toda esta fase e pelas trocas de informações da área científica

A minha avó Silvia e meu avô Deco em memória pela alegria e credibilidade.

AGRADECIMENTOS

À professora Eunice Oba, pela orientação, convívio, aprendizado e não apenas pela extrema colaboração do trabalho, e sim por ter sido a responsável em abrir as portas da faculdade e permitir que eu crescesse e desenvolvesse minha formação profissional. Agradeço pela confiança depositada e pela amizade.

À professora Fernanda da Cruz Landim Alvarenga pela dedicação e colaboração imensurável para realização do trabalho.

Ao professor Sony Dimas Bicudo pela colaboração na busca de informações sobre os ovinos.

Ao médico, amigo Alexandre Naime Barbosa, pela dedicação e paciência nesta fase e neste trabalho. Sua presença foi essencial para a finalização do mesmo.

Ao pós-graduando Gabriel Monteiro pela amizade, ajuda e colaboração no desenvolvimento do trabalho.

À Dra Luciana Leal pela colaboração na parte prática do trabalho e pela amizade.

À doutoranda Jeanne Siqueira pela ajuda ao longo destes 2 anos e pela amizade

À todos os pós-graduando e funcionários do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ- UNESP – Botucatu que direta ou indiretamente proporcionaram benefícios para a realização de todo experimento.

À todos os alunos, estagiários, pos-graduandos que freqüentaram o laboratório Lança no período do experimento

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	Viii
LISTA DE ABREVIACÕES.....	iX
RESUMO	Xi
ABSTRACT	Xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> (MIV)	3
2.1.1 IDADE DO ANIMAL	4
2.1.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO FOLÍCULO	8
2.1.3 QUALIDADE DO OVÓCITO	9
2.2 AMBIENTE DE CULTIVO	10
2.2.1 Tempo de processamento e o ambiente de cultivo <i>in vitro</i>	10
2.2.2. MEIOS DE CULTIVO	12
2.3 FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> (FIV)	14
2.4 PRODUÇÃO DE EMBRIÃO <i>IN VITRO</i> (PIV)	18
2.4.1 SORO	19
2.5 HIPÓTESE.....	20
3. OBJETIVO	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Obtenção e maturação dos ovócitos	21
4.2 Avaliação da maturação nuclear	23
4.3 Fecundação dos ovócitos	25
4.4 Produção de embriões <i>in vitro</i>	25
4.5 Análise estatística.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1. Obtenção de ovários e ovócitos	28
5.2 Fertilização <i>in vitro</i>	32
5.3 Produção de embrião <i>in vitro</i>	35
6. CONCLUSÃO	39
7. REFERÊNCIAS	44

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: A: Lavagem dos ovários de ovelhas; B: Controle da temperatura em 36°C para os ovários e o líquido folicular; C: Aspectos ovariano de ovelhas; D: Aspiração <i>in vitro</i> dos folículos de ovários de ovelhas.....	21
FIGURA 2: Aspecto do sedimento contendo os ovócitos ovinos aspirado	22
FIGURA 3: A e B: Aspectos dos ovócitos de ovelhas aspirados e selecionados Grau III; C: Aspecto de ovócito de ovelha desnudo.....	22
FIGURA 6: Micrografia digital mostrando os aspectos da morfologia nuclear em ovócitos corados com Hoescht A: VG; B: QVG; C: MI; D: MII com extrusão do corpúsculo polar (CP).....	24
FIGURA 9: Aspectos dos embriões de ovelhas produzidos <i>in vitro</i>	26
FIGURA 10: Gráfico da porcentagem de ovócitos que atingiram fase de metáfase II (MII) através da análise da maturação nuclear nos quatro distintos tratamentos MIV.....	32
FIGURA 11: Gráfico da proporção em relação a média final de produção <i>in vitro</i> de Mórulas e Blastocistos ovelhas.....	37

LISTA DE ABREVIACOES

AMPc = adenosina monofosfato cíclico

BSA = Albumina sérica bovina

CG = Células da Granulosa

CIV = Cultivo *in vitro*

COCs = Complexo *cumulus* oocitário

CP = Corpúsculo Polar

CSF = Fatores citostáticos

DOS = oócitos desnudos

E₂ = estradiol

FF = Fluído folicular

FIV = Fertilização *in vitro*

FSH = Hormônio folículo estimulante

G = gauge

GCs = Grânulos corticais

GSH = Glutathiona

H₂O₂ = Peróxido de hidrogênio

HA = cido Hialurnico

ICSI = injeção intracitoplasmática

LH = Hormônio luteinizante

M = Molar

MAPK = *microtubule associated protein kinase*

MCI = Massa celular interna

MI = Metáfase I

MII = Metáfase II

MIV = Maturação *in vitro*

MPF = Fator promotor de maturação

O₂ = Oxigênio

\cdot OH = radicais hidroxil

P₄ = Progesterona

PIV = Produção *in vitro*

QVB = quebra da vesícula germinativa

ROS = espécies reativas de oxigênio

SFB = soro fetal bovino

SOF = *Sintetic oviduct fluid*

VG = Vesícula germinativa

μL = microlitro

μM = micromolar

RESUMO

PAVÃO, G.D. **Maturação nuclear de ovócitos ovinos em meio suplementado com cisteamina, Soro Fetal Bovino (SFB), Albumina Sérica Bovina (BSA) e seus reflexos na produção de embriões ovinos in vitro.** [Nuclear maturation of ovine oocytes in médium with cysteamine, Bovine Calf, Serum (BCS), Bovine Serum Albumin (BSA) and the resulting in vitro embryo. 2008 (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, 2008.

Com o crescimento da ovinocultura brasileira e implemento de biotecnologias da reprodução visando o aumento do rebanho ovino, torna-se importante o desenvolvimento de técnicas eficientes de maturação oocitária nestes animais, visando o melhor aproveitamento do potencial reprodutivo *in vitro* com consequente aumento de produtividade. O objetivo deste trabalho foi comparar a utilização de diferentes suplementos adicionados ao meio de maturação *in vitro* de oócitos ovinos, estabelecendo o mais adequado para posterior produção *in vitro* de embriões. Para isto, foram colhidos ovários de ovelhas abatidas em frigoríficos do estado de São Paulo. Os ovários foram transportados em garrafa térmica com solução salina (NaCl 0,9%) à 36°C até o laboratório da FMVZ-UNESP- Botucatu. No laboratório estes foram lavados com solução salina e aspirados para obtenção dos oócitos. Foram selecionados somente complexos *cumulus* oocito (CCO) que apresentassem citoplasma de aspecto homogêneo e compactação das células do *cumulus*. Os CCO selecionados foram lavados duas vezes em meio TCM-199 com tampão Hepes, suplementado com 10% de SFB, 0,3 mM de piruvato de sódio e 75 µg/mL de amicacina e divididos em diferentes tratamentos de maturação (100 oócitos/grupo): Tratamento 1: TCM-199 acrescido de piruvato de sódio, LH, FSH, estrógeno e gentamicina (Meio Base) + 10% de SFB; Tratamento 2: Meio base + 10% de SFB e 100µM de cisteamina; Tratamento 3: Meio Base + 4mg/ml de BSA; Tratamento 4: Meio Base + 4mg/ml de BSA e 100µM de cisteamina. O cultivo dos oócitos para maturação *in vitro* foi realizado em estufa a 38,5°C em atmosfera com 5% de CO₂ em ar por um período de 20-22h. Ao final do período de maturação nuclear, os ovócitos foram desnudados por pipetagens sendo posteriormente corados com Hoescht 33342 e avaliados quanto a configuração nuclear utilizando-se microscopia de epifluorescência (Leica DMIRB) com luz ultra-violeta. Os ovócitos foram classificados segundo o estágio meiótico em: VG (Vesícula germinativa), QVG (quebra da vesícula germinativa), MI (metáfase I); MII (metáfase II); e DEG (degenerado). Para a análise estatística das características avaliadas, foi empregado o pacote estatístico Statistical Analysis System (SAS), versão 5.0 (1996) (Procedimento MEANS e GLM com P<0,05), utilizando o teste Qui-Quadrado. Avaliando-se a taxa de ovócitos que atingiram a MII, foi observado no grupo 2 (SFB + cisteamina) uma taxa

numericamente superior de 34% aos demais grupos, seguido do grupo 4 (BSA + cisteamina) com 33%, do grupo 3 (BSA) com 28% e do grupo 1 (SBF) com apenas 16%. A análise estatística mostrou inferioridade do G1 em relação ao G2 e G4, com diferença significativa ($p < 0,05$). Já o grupo 3 se posicionou como intermediário, sendo estatisticamente semelhante aos grupos 2 e 4. Concluiu-se que a adição de 100 μ M cisteamina ao meio de maturação de ovócitos ovinos foi benéfica, na presença de SFB. Utilizando o meio de maturação contido de 100 μ M cisteamina adicionado de SFB, realizou-se a fertilização *in vitro* de 1023 ovócitos utilizando meio TALP modificado por um período de 17-18 h. Posteriormente o cultivo celular foi realizado utilizando-se meio SOF. A clivagem das células foi analisada 48 horas após a PIV e a verificação da presença de blastocistos foi realizada no D8. Para a análise estatística das características avaliadas, foi empregado o pacote estatístico Statistical Analysis System (SAS) - versão 5.0 (1996), computadas proporção média de produção de mórulas e blastocistos com seus respectivos erros padrões. A proporção média final de produção de mórulas foi de 2,34%, $\pm 2,45$ %, proporção final de produção de blastocistos foi de 0,90 $\pm 1,81$ %. Apesar da taxa de maturação *in vitro* ter sido benéfica utilizando o tratamento contido de 100 μ M cisteamina, a taxa de produção de blastocisto apresentou-se reduzida.

Palavra – chave: oócito, ovino, embrião, produção *in vitro*

ABSTRACT

PAVÃO, G.D. **Nuclear maturation of ovine oocytes in médium with cysteamine, Bovine Calf, Serum (BCS), Bovine Serum Albumin (BSA) and the resulting in vitro embryo.** [Maturação nuclear de ovócitos ovinos em meio suplementado com cisteamina, Soro Fetal Bovino (SFB), Albumina Sérica Bovina (BSA) e seus reflexos na produção de embriões ovinos in vitro] .2008. (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, 2008.

Nowadays, with brazilian sheep farms growth and reproduction biotechnology implementation aiming for a sheep herd increase, efficient techniques development becomes important in oocytes maturation in these animals, aiming to a better use of the *in vitro* reproductive potential with a consequently increase in production. The aim of this work was to compare the use of different supplements added to the *in vitro* maturation medium of sheep oocytes slaughtered in slaughter houses in São Paulo state. The ovaries were to the FMVZ-UNESP- Botucatu laboratory. In the laboratory, they were washed with saline solution and aspirated for the oocytes recovery. Only complex cumulus oocytes (CCO) that showed homogeneous cytoplasm and cumulus cells compacted were selected. The selected CCO were washed in TCM-199 medium with HEPES tampon, supplemented with 10% of SFB, 0.3 mM of Sodium Pyruvate and 75 µg/mL of amycacin and divided in differentr maturation treatments (20 oocytes/ group): treatment 1: TCM-199 plus Sodium Pyruvate, LH, FSH, estrogen and gentamycin (base medium) + 10% of SFB; Treatment 2: Base medium + 4mg/ml of BSA and 100µM of cisteamine; Treatment 3: Base médium + 4mg/ml of BSA; Treatment 4: Base medium + 4mg/ml of BSA and 100µM of cisteamine. The oocyte cultivate for *in vitro* maturation was done in stove at a 38.5°C atmosphere with 5% of CO₂ in air for a 20-22h period. By the end of the nuclear maturation period, the oocytes were taken off the maturation medium and the granulosa cells were extracted and then they were stained with Hoescht 33342 and evaluated by nuclear configuration using the epifluorescence microscopy (Leica DMIRB) with ultra-violet light. The oocytes were classified by meiotic stage in: GV (germinative vesicle), GVB (germinative vesicle break), MI (metaphase I); MII (metaphase II); and DEG (degenerated). For statistical analysis of the evaluated characteristics, Statistical Analysis System (SAS), version 5.1 (1996) (MEANS and GLM procedure with P<0.05) was used. Was used the the Qui-Quadrad test for analisis. The groups with higher rates of nuclear maturation (MII) were treatment 2 (34%) and 4 (33.00%) being statistically different from treatment 1 (16.%) and 3 (28.00%) (P<0.005). It is concluded that the addition of 100 µM cisteamine to the maturation medium of sheep oocytes did improve the

results as in the presence of SFB. Using the maturation medium with 100 μ M cysteamine, the in vitro fertilization of 1023 oocytes using TALP medium for an 17-18h period and later the cellular culture using SOF medium evaluating the cleavage cells on D8 for verification of blastocyst. The variables were submitted to SAS versão 5.0 (1996). The mean rate of morulae production was $2,34 \pm 2,45\%$ (mean \pm sd), mean blastocyst rate production was $0,9 \pm 1,81\%$. The improvement achieved on oocytes in vitro maturation rates was not followed by increase on mean blastocyst rate when adding 100 μ M of cysteamine at the maturation media.

Key word: oocytes, ovine, embryo, in vitro production

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura é uma atividade economicamente explorada em todos os continentes, sendo exercida em diferentes ecossistemas com os diversos tipos de clima, topografia e vegetação. O crescimento vertiginoso da exploração dos pequenos ruminantes está transformando o cenário dos sistemas produtivos. Ao longo das últimas décadas a criação de ovinos tem sofrido transformações nos diversos elos da cadeia produtiva.

Quanto ao agronegócio brasileiro da ovinocultura de corte, este vem apresentando um crescimento significativo. Segundo dados do IBGE, em 2007 foi registrado 116,239 milhões de animais, 1,4%, maior que o registrado em 2006. Do total de animais, 57,2% estão no Nordeste, embora o principal estado produtor seja o Rio Grande do Sul (3,8 milhões de cabeças ou 23,6% do total).

A indústria de produtos de origem ovina é afetada primeiramente pela qualidade e disponibilidade de alimentos, pelo manejo dispensado aos animais e genética. Aliado a estes fatores destaca-se a eficiência reprodutiva a qual é um ponto crítico nos sistemas de produção.

Devido à alta demanda da carne e pele do interesse na utilização de subsídios para a espécie ovina, o mercado nacional demonstrou necessidade da implementação de biotecnologias para alcançar a meta econômica. Entretanto, para o encurtamento da distância entre a produção e a demanda, é necessário aumentar os índices reprodutivos e promover os progressos genéticos na espécie. No entanto a produção de um grande número de animais de qualidade superior em um curto espaço de tempo tornar-se de difícil execução através do uso de técnicas reprodutivas convencionais.

Na tentativa de acelerar o ganho genético e aumentar o potencial reprodutivo dos ovinos, biotecnologias como Inseminação Artificial (I.A) e Transferências de embriões (TE) podem ser utilizadas, porém ainda existem muitas variações nos resultados obtidos. Recentemente despertou-se o interesse pela técnica de produção de embrião *in vitro* (PIV).

A PIV é uma realidade em diversas empresas comerciais que trabalham para este fim, no mundo inteiro principalmente em bovinos. As empresas nacionais têm absorvido e desenvolvido estratégias alcançando bons resultados, compatíveis com aqueles relatados pela literatura (DAYAN *et al.*, 2000). Apesar disso, de na espécie ovina existem controvérsias em

relação a sua viabilidade e aplicação comercial pois ainda não existe a padronização de meios de cultura e da metodologia como já ocorre em bovinos.

Embora consideráveis avanços estejam sendo realizados neste campo, as taxas de produção de embriões e de prenhes através da PIV, nesta espécie ainda permanecem inferiores ao esperado e uma das maiores dificuldades está no grande número de etapas que envolvem esta tecnologia, sendo a maturação *in vitro* (MIV) uma das etapas mais importantes, seguida da fertilização *in vitro* (FIV) e do cultivo *in vitro* (CIV). A obtenção de ovócitos maturados *in vitro* em quantidade e qualidade é essencial, uma vez que a maturação ovocitária inadequada pode resultar em redução da eficiência de todo o processo de produção de embriões.

Os ovócitos quando removidos dos folículos ovarianos e colocados em meio de cultivo adequado, retomam a meiose que estava parada na prófase da primeira divisão meiótica e progridem até o estágio de metáfase II. Este período é conhecido como maturação oocitária e deve ocorrer tanto no compartimento nuclear quanto no citoplasmático. Uma série de modificações morfológicas e bioquímicas ocorre nesse período, preparando o ovócito para que seja capaz de ser fecundado pelo espermatozóide e de se desenvolver em embrião, feto e neonato.

Subseqüente a esta etapa ocorre a fertilização *in vitro*, fase em que o ovócito já maturado é fecundado pelo espermatozóide em ambiente adequado e controlado para ocorrência da ativação do óvulo e formação do zigoto. Posteriormente, e considerada a fase mais longa de todo processo, ocorre o cultivo *in vitro* em que o zigoto necessita de suplementação adequada para ativar o genoma embrionário e se dividir até o estágio de blastocisto.

Assim, objetivamos com este trabalho avaliar na primeira etapa do experimento o meio MIV mais adequado para que os ovócitos tornem-se maduros, (estágio de metáfase II (MII)). Na segunda etapa do experimento será avaliada a capacidade dos ovócitos maturados *in vitro* de se desenvolverem após a Fertilização *in vitro* (FIV) e Cultivados *in vitro* (CIV) para produção de embriões.

2. Revisão de Literatura

2.1 Maturação *in vitro* (MIV)

Para muitas espécies de mamíferos, os embriões podem ser rotineiramente produzidos em laboratório até o estágio de blastocisto utilizando as técnicas de maturação *in vitro* de ovócitos (MIV), seguido da fertilização *in vitro* (FIV) e posterior cultivo embrionário (CIV).

A maturação representa o período em que o gameta feminino adquire competência e capacidade para suportar os eventos da fecundação e início do desenvolvimento embrionário. Em 1965, Edwards (apud Abeydeera *et al*, 1998) foi quem primeiramente relatou a quebra da vesícula germinativa e a retomada da meiose em ovócitos após sua retirada de folículos e posterior cultivo embrionário *in vitro* em meio suplementado com LH. Está claro que as condições de cultivo durante a maturação *in vitro* podem influenciar beneficemente ou não o subsequente desenvolvimento embrionário. Assim, a identificação de fatores que interferem neste processo e a correção dos mesmos pode aumentar a viabilidade do cultivo de embriões (KRISHER & BAVISTER, 1998).

Os meios de cultura e suas suplementações são fundamentais nos sistemas de maturação *in vitro*. Muitos estudos têm examinado seus efeitos sobre o potencial de desenvolvimento de embriões, favorecendo a produção de blastocistos (KRISHER & BAVISTER, 1998). Entretanto, alguns problemas atribuídos a esta etapa podem ser observados, entre eles, a deficiência de maturação nuclear e conseqüentemente a diminuição dos índices de clivagem da célula.

Nos mamíferos, os ovócitos encontram-se bloqueados no estágio de prófase da meiose I (vesícula germinativa), até progredirem para a fase de metáfase II (MII), quando ocorre novo bloqueio do ciclo meiótico. Este ciclo só será reiniciado e completado *in vivo* após a ovulação quando houver a fecundação pelo espermatozóide que provocará a ativação do óvulo, ou *in vitro* após a MIV seguida da FIV. Uma vez ativado, o ovócito completa a meiose e inicia os ciclos mitóticos do desenvolvimento embrionário (Bayard *et al.*, 2002).

O processo através da qual a meiose é reiniciada, ocorre a partir da prófase I e é concluído na fase de metáfase II, sendo chamado de maturação oocitária. A maturação é caracterizada por duas fases, a maturação nuclear que consiste na modificação da configuração da cromatina, característica da progressão do ciclo celular (Prófase I, anáfase I, telófase I e metáfase I seguida da primeira divisão meiótica e formação da placa metafásica II)

e a maturação citoplasmática constituída de modificações bioquímicas e morfológicas como as modificações no citoesqueleto (KIM *et al.*, 2000), síntese e fosforilação de diversas proteínas (MOTLIK *et al.*, 1998) etc, que culminam com a aquisição do ovócito à capacidade de desenvolver-se em um embrião.

Este processo de maturação é controlado, principalmente pelo fator promotor de maturação (MPF) (composto dimérico formado por uma subunidade catalítica), tanto na meiose quanto na mitose. O MPF é uma proteína quinase composta por duas sub-unidades, a p34 cdc2 sintetizada constantemente e a ciclina B que é sintetizada e destruída ciclicamente, ocorrendo assim o controle cíclico característico do ciclo celular. O MPF encontra-se em níveis basais no estágio de vesícula germinativa (VG) e quando a meiose é iniciada, este começa a elevar-se, atingindo picos em Metáfase I (MI), declinando novamente, e só na fase de Metáfase II (MII), atinge os picos máximo, permanecendo neste estado até haver a ativação do ovócito após a fecundação (MOTLIK *et al.*, 1998).

A diminuição dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) nos complexos *cumulus* oocitários (COCs), leva a inibição da atividade de MPF, assim quando há aumento da concentração do AMPc, desencadeia-se a ativação do mesmo, induzindo a retomada da meiose. Uma vez ativado, o MPF desencadeia os eventos observados na maturação nuclear como quebra vesícula germinativa (QVG), condensação dos cromossomos, formação do fuso meiótico e extrusão do primeiro corpúsculo polar (CP) (KIM *et al.*, 2000).

Além do MPF, outro fator importante que participa do controle da meiose do ovócito, é a quinase da proteína associada ao microtúbulo (*microtubule associated protein kinase* – MAPK). A MAPK está envolvida na dinâmica dos microtúbulos que são responsáveis pelo deslocamento da cromatina para a periferia e rearranjo das organelas no citoplasma do oócito. Esta torna-se ativada na retomada da meiose (QVG) após a ação do MPF, porém ao contrário deste, a MAPK mantém-se elevada constantemente entre MI e MII (MOTLIK *et al.*, 1998).

Para que o ovócito seja capaz de maturar, ser fecundado e desenvolver-se em um embrião viável, é necessário que ele seja capaz de suportar a cascata de eventos que culminam com a aquisição da competência para o desenvolvimento. A maturação deve englobar as modificações nucleares e citoplasmáticas, pois apesar de ocorrerem simultaneamente, são fatores independentes entre si (MOTLIK *et al.*, 1998).

Os ovócitos de boa qualidade que conseguem atingir o estágio de placa metafásica II (maturação nuclear), permanecem nesta fase até haver a penetração pelo espermatozóide e isto ocorre devido à elevação da atividade do MPF presente, mantido através da ação de fatores citostáticos (CSF) responsáveis por catalisarem proteínas reguladoras envolvidas no

controle da G1 (GANDOLFI *et al.*, 1998). Já ovócitos incompetentes, são deficientes na produção de RNAs mensageiros e possuem baixa atividade do MPF e outros fatores associados a meiose.

Alguns fatores interferem na maturação oocitária, como a idade do animal doador, qualidade do ovócito, características morfológicas dos folículos e suplementos adicionados no meio de maturação, como os substratos energéticos e aminoácidos, fatores de crescimento (WATSON *et al.*, 2000) ou ainda antioxidantes precursores de glutathione intracelulares como o β -Mercaptoetanol, cisteamina, ou cisteína já descritos nas espécies bovinas (DE MATOS *et al.*, 2002^a), bubalina (GASPARRINI *et al.*, 2003), e ovina (DE MATOS *et al.*, 2002b).

2.1.1 Idade do animal

Nos últimos anos, tem havido interesse crescente na utilização de fêmeas pré-púberes como doadoras de ovócito, por possibilitarem a aceleração dos ganhos genéticos do rebanho, através da redução do intervalo entre gerações (BERNARDI, 2005). A fertilização *in vitro* (FIV) de ovócitos destes animais jovens, tem como objetivo diminuir o intervalo entre gerações e acelerar o processo de multiplicação de animais considerados geneticamente superiores (BALDASSARE *et al.*, 2003).

A quantidade de ovócitos recuperados de fêmeas pré-púberes, bem como a capacidade de desenvolvimento *in vitro* até o estágio de blastocisto, dependem da utilização de protocolos de estimulação hormonal (O'BRIEN *et al.*, 1997), que têm sido empregados em fêmeas com idade entre três semanas até quatro a seis meses (BERNARDI, 2005).

Porém, alguns autores (LEDDA *et al.*, 1997; O'BRIEN *et al.*, 1997) constataram que os ovócitos recuperados das fêmeas jovens possuem menor potencial para a produção de embriões, maior incidência de polispermia, menor capacidade de desenvolvimento até o estágio de blastocisto e menor proporção de maturação nuclear em estágio de metáfase II (MII) após 20 h de cultivo, quando comparado com fêmeas adultas (LEONI *et al.*, 2006).

Foram verificadas diferenças metabólicas e estruturais entre ovócitos de ovelhas de diferentes classificações etárias. Os provenientes de fêmeas jovens apresentaram menor metabolismo da glutamina, menor tamanho das mitocôndrias e dos grânulos corticais tanto após procedimentos de maturação *in vivo* quanto *in vitro* (O'BRIEN *et al.*, 1997). Essas diferenças foram associadas a uma maturação citoplasmática e nucleares inadequadas, que implicaria em uma menor capacidade de desenvolvimento embrionário.

Quando ovócitos de ovelhas pré-púberes (30-40 dias) foram submetidos à MIV e não receberam um prévio tratamento hormonal, somente 8% conseguiram atingir o estágio de MII em comparação à 58% nas adultas. Os primeiros apresentaram diâmetro inferior com menor habilidade para a progressão meiótica devido à presença de menor número de receptores para as gonadotrofinas, menor número de células do *cumulus* e redução de fatores intrínsecos ligados ao metabolismo energético, resultando em menor capacidade de desenvolvimento *in vitro* até o estágio de blastocisto (LEDDA *et al.*, 1997).

A velocidade em que o ovócito se divide após a fertilização, também representa outro fator que influi diretamente na qualidade do embrião, como o observado em estudos prévios, (LONERGAN *et al.*, 2000; FENWICK *et al.*, 2002), em que as células que clivaram rapidamente, obtiveram melhores índices de qualidade embrionária. Apesar de Ptak *et al.*, (1999), não ter observado diferença na velocidade de clivagem quando comparou embriões PIV de ovelhas pré-púberes com os de adultas, outros autores (LEONI *et al.*, 2006), relataram retardo de quatro horas no desenvolvimento de embriões para o estágio de blastocisto nos ovócitos provenientes de ovelhas mais jovens. Segundo Leoni *et al* (2006), os ovócitos dos animais pré-púberes demoraram para iniciar a clivagem 32 horas após a FIV, em comparação com as 26 horas em adultos. Este atraso na clivagem não foi causado pelo retardo da penetração do espermatozóide na célula, pois este conseguiu regular o tempo de início da replicação de DNA durante a fase G1. Porém houve demora no início da fase S, promovendo grande impacto na duração do primeiro ciclo celular e subsequente desenvolvimento embrionário, devido ao comprometimento do ooplasma da célula (SALAMONE *et al.*, 2001).

Os ovócitos removidos de folículos antrais de ovelhas pré-puberais e cultivados em condições apropriadas, conseguiram atingir o estágio dictiado da fase de prófase da meiose I, extruíram o primeiro corpúsculo polar e atingiram o estágio de metáfase da meiose II do mesmo modo que os provenientes de animais adultos (LEDDA *et al*, 1997), porém, a proporção de embriões de ovelhas pré-púberes que conseguiram atingir o estágio de blastocisto e que conseguiram sobreviver após transferência para ovelhas sincronizadas foi menor quando comparado aos embriões originados de ovócitos de animais adultos (LEDDA *et al.*, 1999; PTAK *et al.*, 1999).

As flutuações da atividade de MPF foram verificadas nos ovócitos durante a progressão meiótica tanto nas fêmeas pré-puberais quanto nas adultas, porém no estágio de MII a atividade de MPF apresentou-se diminuída nas células de cordeiras, devido a deficiências da síntese da ciclina B e ao defeito na fosforilação de resíduos da treonina-

-serina, que afetou a formação do complexo de MPF, tornando este insuficiente para o ovócito (LEDDA *et al.*, 2001).

Assim, ovócitos na fase de MII, derivados de ovelhas pré-púberais foram incapazes de induzir a desestabilização da membrana nuclear e a condensação cromossômica na vesícula germinativa (VG) após 1-2 horas de fusão; nos animais idosos ou em condições subótimas de cultivo, os níveis da atividade de MPF também foram diminuídos (LEDDA *et al.*, 1997).

Segundo Fukui *et al.*, (1988), os ovócitos provenientes de fêmeas pré-púberes apresentaram anormalidade da atividade do ciclo celular, na regulação do MPF (Fator promotor de maturação) durante a meiose que resultaram em aumento na incidência de partenogênese, migração irregular dos grânulos corticais e aumento da poliespermia. Assim, a atividade do MPF que é regulada pela degradação e a re-síntese da ciclina B durante a transição de MI para MII, demonstrou ser menor nos ovócitos de animais pré-púberes na fase de MII. Esta capacitação insuficiente durante o crescimento folicular, resultou em subestocagens de RNAm, e conseqüentemente, em quedas no desenvolvimento e na qualidade deste embrião, fazendo com que esta célula precisasse de mais tempo para completar cada ciclo celular do embrião. Dados semelhantes foram confirmados por outro autor (LEONI *et al.*, 2004).

A tradução do RNAm estocado no ovócito e sua degradação é regulada durante o desenvolvimento embrionário (GANDOLFI & GANDOLFI, 2001). Desta forma, a ativação do genoma embrionário representa a mudança do controle do desenvolvimento do genoma da mãe para do embrião. Embriões bovinos e ovinos que estavam no estágio de 8-16 células (TELFORD *et al.*, 1990), começaram a sintetizar seu próprio RNAm, limitando a utilização de RNAm de origem materna. Em bovinos, alguns autores observaram diminuição na estocagem de RNAm na mãe no estágio de 8 células, bem no momento em que ocorre a transição do genoma maternal para o embrionário. Portanto, os embriões derivados de ovócitos de animais pré-púberes, demonstraram bloqueio de desenvolvimento no estágio de 16-32 células, que coincidiu com a queda da ativação do genoma embrionário causada pela falta de RNAm ou de proteínas (GANDOLFI & GANDOLFI *et al.*, 2001). Fato semelhante foi verificado também em ovócitos de ovelhas pré-púberes fertilizados *in vitro*, que demonstraram atraso em atingir a primeira clivagem e o estágio de blastocisto (LEONI *et al.*, 2006).

2.1.2 Característica morfológica do folículo

Múltiplos fatores estão envolvidos na dinâmica folicular durante o estro e anestro e na qualidade dos Complexos *cumulus* oocitários COCs. Constatou-se que a competência oocitária é adquirida durante a foliculogênese e afetada por diversos fatores, como estação do ano, tamanho do folículo; estresse, nutrição, sanidade e idade do animal (LONERGAN *et al.*, 1994; MORTON *et al.*, 2005).

Segundo Cognié *et al.*, (2004), as características ovarianas como presença de diferentes tamanhos foliculares, e do corpo lúteo (C.L.), influenciaram a produção de embriões tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Diversos autores constataram que nos ovinos a competência oocitária *in vitro* está relacionada ao tratamento hormonal prévio, condição endócrino em que a ovelha se encontrava e condição ovariana da doadora. Quando foi observado na doadora presença do corpo lúteo no ovário e esta foi submetida à aspiração dos folículos para PIV, houve maior produção de embriões de melhor qualidade, diferente de quando o folículo dominante esteve presente em um ou em ambos os ovários o que resultou em efeito maléfico no desenvolvimento de embriões *in vitro* (BERLINGUER *et al.*, 2006).

Além disso, as características macroscópicas do folículo influenciaram o potencial de maturação nuclear e citoplasmática do ovócito. Em bovinos, quando os ovócitos foram obtidos de folículos menores que 2mm de diâmetro, verificou-se irregularidades no núcleo e no citoplasma e estes não conseguiram reiniciar a meiose, sendo incompetentes para o desenvolvimento tanto após a FIV como após a ativação partenogenética (BERLINGUER *et al.*, 2006). Da mesma forma, uma elevada porcentagem de ovócitos presentes em folículos maiores do que 8mm apresentaram-se em processo de atresia ou em maturação precoce, com a viabilidade comprometida na PIV (BAYARD *et al.*, 2002).

Em ovelhas, os ovócitos que foram aspirados de folículos pequenos (1-2mm), apresentaram diâmetro inferior, e falha em completar a meiose *in vitro*, devido ao crescimento incompleto, pois o tamanho do folículo afetou diretamente a ligação entre as células do *cumulus* e o ovócito (LEDDA *et al.*, 1999). De forma que a população ovariana oscilou entre as estações do ano, tanto em ovelhas como nas outras espécies, entre 3 a 16 folículos por ovário (LEDDA *et al.*, 1997).

Em ovelhas, os ovócitos aspirados de ovários que continham quantidade de folículos inferior à 4, demonstraram baixos índices de clivagem (67%), em relação aos que possuíam 5-7 folículos (grupo intermediário) (72%) ou 8 ou mais (grupo alto). Da mesma forma, houve maior proporção de blastocistos produzidos quando os ovários possuíam grandes números de

folículos presentes (grupo alto) (44%), do que do grupo intermediário (33%) e ou o grupo baixo (28%) (MOSSA *et al.*, 2007).

2.1.3 Qualidade do ovócito

O ovócito presente no interior do folículo está envolto pelas células da granulosa, formando o complexo *cumulus* oocitário (CCOs). Estas células do *cumulus* possuem função diferenciada daquelas presentes na parede do folículo, pois, devido ao íntimo contato entre elas, substâncias reguladoras são produzidas pelos ovócitos, exercendo função na atividade das células do *cumulus*, da mesma maneira que componentes destas células, possuem participação ativa no mecanismo de crescimento e maturação dos ovócitos (BAYARD *et al.*, 2002).

Durante a maturação, os ovócitos produzem hormônios endógenos e fatores intrínsecos que estimulam a síntese de ácido hialurônico pelas células do *cumulus* induzindo a mucificação ou a expansão destas durante a maturação, que posteriormente importantes serão para a fertilização e capacitação espermática. A comunicação entre as células do *cumulus* e o ovócito têm sido demonstrada no CCO de diversas espécies através das junções gap intercomunicantes, importantes para que ocorra a passagem de nutrientes e componentes químicos reguladores para a maturação do oócito (Bayard *et al.*, 2002). Apesar das células do *cumulus* não serem essenciais para a maturação dos ovócitos, os melhores resultados de maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário, foram alcançados quando estas células estavam presentes (BING *et al.*, 2002).

Desta forma, para que ocorra a competência oocitária e posterior desenvolvimento embrionário, é necessário que o ovócito apresente ooplasma homogêneo, com granulações finas, de coloração uniforme e esteja envolvido por várias camadas de células do *cumulus* dispostas de forma compacta, as quais são classificados pela escala de um (envolvidos por várias camadas de células do *cumulus*) à quatro (com ausência de camadas de células do *cumulus*) (BAYARD *et al.*, 2002). Os ovócitos desnudos, demonstram maior susceptibilidade ao estresse oxidativo e precocidade na degeneração celular. Por outro lado várias camadas de células do *cumulus* envolvendo os oócitos, auxiliam na neutralização dos radicais presentes nos sistemas *in vitro*, e no aumento nos índices de clivagem (TATEMOTO, *et al.*, 2000).

Em ovinos (STAIGMILLER AND MOOR, 1984); porcas (YAMAUCHI AND NAGAI, 1999) e vacas (CHIAN *et al.*, 1994; GESHI *et al.*, 2000); os ovócitos que

apresentavam diminuição ou ausência (DOS) das células do *cumulus*, conseguiram completar a maturação meiótica *in vitro*, porém com uma competência para o desenvolvimento embrionário diminuída (CHIAN *et al.*, 1994).

2.2 Ambiente de cultivo

2.2.1 Tempo do processamento e o ambiente de cultivo *in vitro*

O tempo utilizado entre a coleta dos ovários e o processamento no laboratório é essencial para obter ovócitos de boa qualidade para a realização das etapas da PIV. A partir do momento em que estes são removidos do ambiente folicular, deixa de haver o estímulo inibitório que é o responsável por manter o bloqueio meiótico e então a meiose é reiniciada. Por outro lado algumas vezes este reinício acaba sendo precoce, e ovócito ainda não está apto para ser maturado, fertilizado e desenvolver-se (HYTTEL *et al.*, 1997; HENDRIKSON *et al.*, 2000).

Em bovinos, o melhor resultado de MIV encontrado ocorreu quando o ovócito era mantida dentro dos folículos ovarianos por até quatro horas após o abate, em comparação com o processamento imediato destes (HENDRIKSON *et al.*, 2000). Entretanto, os ovócitos de ovelhas pré-púberes, apresentaram maior sensibilidade quando o tempo entre a coleta dos ovários e o processamento destes, excedeu um período de três horas, resultando no aumento da taxa de ovócitos degenerados (LEONI *et al.*, 2006).

Após a aspiração e seleção dos folículos ovarianos, ovócitos ovinos foram submetidos à MIV por um período que variou entre 22-24 horas, em estufa controlada em atmosfera de 5% de CO₂ e 20% de O₂ em ar, que demonstrou ser satisfatório para atingir a maturação oocitária adequada nesta espécie (LEONI *et al.*, 2006). Porém quando os ovócitos eram de baixa qualidade, com presença diminuída ou ausência das células do *cumulus*, foi necessário diminuir a tensão de oxigênio no cultivo, pois a atmosfera usualmente utilizada, resultou em baixos índices de desenvolvimento de produção de embriões (WATSON *et al.*, 1994; BERNARDI *et al.*, 2005).

Entretanto, independente da presença ou não de células do *cumulus* nos ovócitos, houve desenvolvimento mais rápido de zigotos ovinos quando estes foram cultivados *in vitro* em meio “*Sintetic oviduct Fluid*” (SOF), sob baixas tensões de O₂, (5%) em comparação aos zigotos cultivados sob alta tensão de O₂ (20%) (BERNARDI *et al.*, 2005). Quando os zigotos

foram expostos a altas tensões de oxigênio entraram em apoptose celular devido à grande produção de radicais livres (ROS) que resultaram em injúria na célula e diminuição do posterior desenvolvimento embrionário. Durante o metabolismo celular, os (ROS), que incluem ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxil ($\cdot OH$), são constantemente liberadas do processo de quebra de ATP (fonte energética celular) (FEUGANG *et al.*, 2004). Porém, a redução das tensões de O_2 de 20% para 5%, diminuiu a incidência de produção de ROS, aumentando a competência celular, e posterior formação do pró-núcleo masculino (MURDOCH, 1998), tanto em ovelhas (THOMPSON *et al.*, 1990), ratos (QUINN AND HARLOW 1978), coelhos (LI AND FOOT, 1993), porcas (WRIGHT, 1977), e vacas (THOMPSON *et al.*, 1990; YANG *et al.*, 1994). Embora o resultado seja benéfico no desenvolvimento embrionário, houve variação na melhora dos grupos em relação à maturação nuclear (BING *et al.*, 2002).

Para prevenir os danos causados por ROS nos sistemas *in vitro* em ovócitos de baixa qualidade, antioxidantes tem sido adicionados no meio de maturação, dentre eles os componentes thiol de baixo peso molecular (β -mercaptoetanol, cistina, cisteína e cisteamina), que atuam como precursores de glutathiona (GSH) (VAN SOOM *et al.*, 2002), além de outros agentes como a transferrina, lactoferina, vitamina E e C e taurina (LIM & HANSEL, 2000).

Em bovinos, o aumento da glutathiona (GSH) intracelular induzidos por composto thiol durante a MIV, promoveu condições intracelulares favoráveis para suportar a fertilização *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV) por se tratar de um sistema antioxidante eficiente (KNAPEN *et al.*, 1999), protegendo a célula contra os radicais livres normalmente gerados pelo metabolismo oxidativo.

Estudos em diversas espécies como a bovina (DE MATOS *et al.*, 2002a; VAN SOOM *et al.*, 2002; AVELINO 2004), ovina (DE MATOS *et al.*, 2002b), caprina (RODRIGÉZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2003), e bubalina (GASPARRINI *et al.*, 2000, 2003), suplementaram o meio MIV com os precursores da síntese de GSH intracelular na espécie e observaram aumento da síntese de GSH, que proporcionou maior competência dos ovócitos e melhora nas taxas de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (DE MATOS & FURNUS, 2000).

Em ovelhas, este efeito benéfico na maturação oocitária foi maior, quando o meio foi suplementado com 100 μ M cisteamina do que quando utilizou-se 200 μ M no meio MIV (DE MATOS *et al.* 2002). Porém quando adicionaram antioxidante na FIV ou no CIV, houve um efeito deletério para a produção embrionário (Ali *et al.*, 2003), provavelmente porque certos

níveis de ROS são necessários para que ocorra a capacitação espermática e conseqüentemente a fusão entre os gametas (DE MATOS *et al* 2002).

2.2.2 Meios de cultivo

A composição do meio de cultivo afeta diretamente a produção de embrião. Assim, o meio de maturação normalmente utilizado é suplementado com hormônios (LH, FSH, estrógeno), soro fetal, (SFB), e ou albumina sérica bovina (BSA) (THOMPSON, 2000); Além disso, macromoléculas e fatores de crescimento, podem ser adicionados como suplementação para a PIV de cabras e ovelhas por exercerem importante função na regulação da maturação do ovócito (DOWNS & MASTROPOLO, 1997).

Alguns estudos verificaram que a adição dos hormônios no meio MIV melhora a FIV e o posterior desenvolvimento embrionário de ovócitos imaturos de vacas e ovelhas, além de proporcionarem a expansão das células da granulosa em diversas espécies (CHOI *et al.*, 2001).

O hormônio folículo estimulante (FSH) frequentemente é adicionado no meio MIV para melhorar a qualidade do ovócito. Alguns autores (Ali *et al.*, 2002), demonstraram que tanto em bovinos, como em roedores, o FSH adicionado no meio e nas condições definidas de cultivo, auxiliou na habilidade do ovócito em alcançar o estágio de blastocistos pós-fertilização. Isto ocorre porque as células do *cumulus* mediam a ação do FSH para que ocorra a maturação oocitária através de receptores de RNAm de FSH que estão presentes tanto nas células da granulosa como nas células do *cumulus*; apesar destes não terem sido detectados nos ovócitos de bovinos provenientes dos folículos antrais (diâmetro 2-8mm) (EPPING *et al.*, 2000). Para ocorrer à expansão das células do *cumulus*, o FSH induz a liberação de diversos fatores, principalmente do ácido hialurônico (HA) que possui capacidade hidrofílica retendo a água e promovendo a mucificação das células do *cumulus*, para suportar a fertilização (Ali *et al.*, 2003).

Outros fatores como a *inter-alpha-trypsin inhibitor* (IαI) e o *tumor necrosis factor-stimulated gene- 6* (TSG-6), foram reportados como fatores condutores expressos pelas células do *cumulus* e portanto implicados na estabilidade da matriz das células do *cumulus* (MC KENZIE *et al* (2004). Desta forma, o FSH induziu a produção de substâncias sinalizadoras nas células somáticas, que estimularam a retomada da meiose nos ovócitos

cercados de células do *cumulus*, porém o mesmo não foi observado nos ovócitos desnudos (BYSKOW *et al.*, 1997).

Segundo Mc Kenzie *et al* (2004), há uma correlação entre a expressão do gene das células do *cumulus* dos genes para ácido hialurônico sintetase 2 (HAS2), ciclo oxigenase 2 (COX2; PTGS2) *and gremlin* (GREMI), como subseqüente desenvolvimento embrionário. Outros achados demonstraram que a expressão destes genes nas células do *cumulus* em cultivo de bovinos foram estimulados pelo FSH (RICHARDS *et al.*, 2001).

Assim, quando o meio MIV não apresentava a adição de gonadotrofinas ou apenas com a presença do LH, houve retardo ou inexistência da expansão das células do *cumulus* nos ovócitos de ovelhas, bem como na retomada da meiose, além do baixo desenvolvimento embrionário (ACCARDO *et al.*, 2004). Entretanto outros autores (ANDRIESZ *et al.*, 2000; CHOI *et al.*, 2001; ALI & SIRARD, 2002^a) verificaram que apenas a utilização de LH no meio MIV, não influenciou na competência oocitária em bovinos e ovinos e quando o meio foi suplementado com somente LH sem a presença do SFB, houve melhora na MIV, FIV e desenvolvimento dos embriões (MARTINS *et al.*, 1998).

O estradiol é um esteróide produzido pelas células da granulosa dos folículos, responsável pela inibição das gonadotrofinas hipofisárias, e pelas manifestações de cio *in vivo*. A sua alta concentração, característica do proestro (devida à sua produção pelo folículo dominante pré-ovulatório), é determinante do pico pré-ovulatório das gonadotrofinas, contrastando com seu efeito inibitório induzido por concentrações mais baixas nas outras fases do ciclo estral (LI *et al.*, 2000).

Em ratos, o estrógeno (E₂) promoveu a quebra da vesícula germinativa, demonstrando, que tanto este, como outros esteróides, estão envolvidos diretamente na manutenção dos ovócitos na parada da meiose devido à presença de receptores específicos deste hormônio nas células da granulosa (DANFORTH, 1995). Em ovócitos de ovelhas, foram verificados, ao redor das células do *cumulus*, receptores de estradiol (TOMANEK *et al.*, 1997), como o ER (alpha) e o ER (beta), bem como em outros compartimentos durante os estágios iniciais do crescimento folicular, indicando que o E₂ possui potencial na regulação da função de diferentes tipos celulares presentes no ovário (JUENGEL *et al.*, 2006).

O ovócito por si só possui envolvimento na função esteroideogênica das CG em algumas espécies (Li *et al.*, 2000). Chian *et al.*, (1999), demonstraram a capacidade de produção de E₂ pelas células do *cumulus* de bovinos em meios de cultivo isentos de esteróides. Porém quando os ovócitos estavam desnudos e foram co-cultivados em meio MIV (TCM 199, glutamina, FSH, LH, penicilina, estreptomicina, 20% SFB e piruvato), foi

observado maiores concentrações de estradiol (378,69 +- 54,34 pg/mL), do que no grupo de ovócitos desnudos que foram previamente cultivados por 26 horas, pois neste último, a simples remoção do ovócito durante as primeiras 26 horas do cultivo das células do *cumulus*, incentivou a luteinização das mesmas, diminuindo o potencial de secreção de E₂ nas células (MOALEMIAN *et al.*, 2007).

As primeiras 26 horas do cultivo das células do *cumulus*, representam o principal momento em que ocorre a esteroidogênese havendo comprometimento de algumas funções normais do ovócito quando estas estavam ausentes, demonstrando efeito positivo da produção de E₂ pelas células do *cumulus* nas condições *in vitro* (MOALEMIAN *et al.*, 2007). Este mesmo autor verificou que ocorre efeito duplo, de inibição e estimulação na produção de E₂ pelas células do *cumulus*. Desta forma, quando os ovócitos desnudos foram cultivados junto com as células do *cumulus* em meio MIV, ou seja, sem o contato de célula com célula, ocorreu o efeito estimulatório. Em porcas a resposta do ovócito à estes sinais não necessitou de um contato físico entre as células, pois a substância ativa foi secretada no meio através da célula germinativa (LUCIDI *et al.*, 2003). Porém nas ovelhas, para que ocorresse o efeito inibitório, foi necessário haver o contato de célula para célula (MOALEMIAN *et al.*, 2007).

O envolvimento do estradiol na MIV do ovócito varia nas diferentes espécies. Em porcas, o estradiol não está envolvido na maturação nuclear e citoplasmática (DODE & GRAVES, 2003). Já a suplementação do meio MIV de cães com E₂, demonstrou um aumento de ovócitos que atingiram o estágio de MII (KIM *et al.*, 2000). Em bovinos, o E₂ na MIV nuclear, não apresentou efeito satisfatório tanto nos DOS nem nos COCs, resultando em dispersão anormal dos cromossomos e redução nos índices de desenvolvimento embrionário (MODINA *et al.*, 2000)). Porém quando apenas o r-FSH foi adicionado no meio, ou este foi associado com E₂ no meio MIV, houve efeito satisfatório na progressão do ciclo meiótico, em ovócitos provenientes de vacas (MODINA *et al.*, 2000), mulheres (ANDRIESZ *et al.*, 2000; MIKKELSEN *et al.*, 2000), e ovelhas (ACCARDO *et al.*, 2004), mostrando a necessidade da utilização de gonadotrofinas na retomada da meiose em ovócitos de mamíferos.

2.3 Fertilização *in vitro*

Tanto nos sistemas *in vivo* quanto *in vitro*, há diferenças nos índices de fertilidade entre os carneiros (HUNEAU & CROZET *et al.*, 1994), que limita a seleção comercial de machos para a utilização na inseminação artificial e até mesmo para a implementação de

tecnologias como a produção de embriões *in vitro* (PIV). Alguns estudos relacionaram estas diferenças entre os carneiros utilizados, mas não entre os ejaculados do mesmo animal (SMITH *et al.*, 1997). Apesar da simples seleção do sêmen eliminar as diferenças entre os carneiros em relação a motilidade, a variabilidade de cada ejaculado entre mesmo carneiro permanece (SMITH *et al.*, 1997).

Segundo Evans & Maxwell, (1990), o sêmen do carneiro variou em relação à fertilidade *in vitro*, entre diferentes carneiros utilizados para o mesmo procedimento. As diferenças de fertilidade ocorreram entre carneiros e entre ejaculados de um mesmo carneiro (WINDSOR, 1997; SMITH *et al.*, 1996).

Para a realização da FIV, a integridade da zona pelúcida do ovócito é essencial para determinar a habilidade espermática *in vitro* (WINDSOR, 1997). Assim, cada sêmen de carneiro utilizado, influencia nos índices de fertilização após a FIV e nos posteriores índices de desenvolvimento embrionário (FUKUI *et al.*, 1988).

Para minimizar a heterogeneidade da população espermática dos carneiros, procedimentos como lavagens, centrifugação através da densidade de gradiente Percoll e a técnica de swin-up foram utilizados. Porém as diferenças na fertilidade persistiram tanto nas técnicas *in vivo* quanto *in vitro*, pois, apesar destas técnicas eliminarem características dos espermatozoides como a motilidade, características intrínsecas como lesão de membrana e ou acrossomal permaneceram e afetaram os posteriores índices de desenvolvimento embrionário *in vitro* (MORRIS *et al.*, 2003). Já a técnica de injeção intracitoplasmática (ICSI) utilizada para tratamentos severos de infertilidade em humanos, não demonstrou sucesso quando foi aplicada para os pequenos ruminantes (GOMEZ *et al.*, 1998).

Na tentativa de eliminar a variabilidade na qualidade espermática entre os carneiros, o sêmen foi selecionado baseado no critério comercial de que o sêmen pós-descongelamento não pode apresentar menos que 30% de motilidade total (EVANS & MAXWELL, 1990). Através desta análise pós-descongelamento foi possível prever a posterior produção de blastocistos *in vitro* nesta espécie muito mais do que a avaliação após o processamento do sêmen pelo gradiente de Percoll, bem como a simples avaliação de algumas características espermáticas, como o status da capacitação e a integridade da membrana plasmática que segundo (EVANS & MAXWELL, 1990), também demonstraram serem incapazes de selecionar as diferenças entre os machos.

De todos os ovócitos utilizados e submetidos a FIV com sêmen congelado pelo método rápido para a produção de blastocistos *in vitro*, houve melhora nos índices de clivagem (49%) em ovinos (BYRNE *et al.*, 2000), e bovinos (LONERGAN *et al.*, 1999).

Embora, Fukui *et al.* (1988) quando utilizou sêmen fresco e Morris *et al.* (1998), sêmen congelado, observaram que o carneiro por si só pode afetar tantos os índices de fertilização *in vitro*, como a habilidade de clivagem do ovócito para o desenvolvimento do blastocisto. Segundo Cognié *et al.* (2004), a centrifugação do sêmen pelo gradiente de Percoll foi superior aos outros procedimentos de separação dos espermatozóides ovinos para sêmen congelado (RHO *et al.*, 2001). Neste procedimento, os espermatozóides viáveis são coletados do botão da fração de 90%, diluídos em uma concentração de 10^7 espermatozóides/mL, incubados por um período de uma hora e suplementados com 10% de soro inativados de ovelhas para a utilização no meio FIV de ovelhas e de cabras, para ocorrer a capacitação espermática (COGNÍÉ *et al.*, 2003).

Segundo estudos (VALCARCEL *et al.*, 1996), o processamento do sêmen pelo gradiente de densidade de Percoll seleciona os espermatozóides em relação a motilidade e a integridade da membrana plasmática e ou acrossomal dos espermatozóides de carneiros congelados ou descongelados, beneficiando as amostras de sêmen a motilidade apresentava-se inferior a 50%.

Apesar deste procedimento selecionar os espermatozóides que possuem integridade de membrana e alta motilidade, quando quatro carneiros diferentes foram utilizados para a retirada das amostras, verificou-se diferenças em relação a motilidade pós-descongelação as quais não foram eliminadas após o processamento com Percoll (MORRIS *et al.*, 2003). Estudos realizados em carneiros (HUNEAU & CROZET, 1994), e humanos (WRAMSBY & LIEDHOLM, 1986), mostraram que a variabilidade de fertilidade entre os machos pode ser consequência da variação existente entre o potencial de capacitação da população espermática. Assim, a elevação de cálcio durante o processo de capacitação do sêmen fresco *in vivo*, foi o responsável por eliminar as diferenças entre os carneiros na subsequente produção embrionária (HUNEAU & CROZET, 1994). Porém, quando o cálcio foi adicionado *in vitro* no meio SOF de ovelhas, não houve melhora nos índices de fertilização quando o sêmen congelado foi utilizado (HOLM *et al.*, 1994).

De acordo com Morris *et al.* (2003), qualquer tratamento para promover a capacitação espermática em células descongeladas não foi benéfica, pois a população espermática pós-descongelação é muito frágil, e não necessitou de suplementação para promover a capacitação espermática, pois estas células tenderam a ter reação acrossomal espontânea. E, portanto, qualquer tratamento realizado para promover um aumento na reação acrossomal para a realização da FIV de ovelhas, demonstrou ser maléfica.

Segundo alguns autores (GANDOLFI, 1998), o declínio da produção de embrião *in vitro* ocorreu devido deficiências encontradas nas condições de cultivo e nos ovócitos que exerceram maiores influências do que o genoma paterno. A maioria dos embriões produzidos *in vitro*, ficaram bloqueados antes de ter ocorrido a ativação do genoma embrionário, momento este que coincidiu com a diminuição do RNAm.

Em embriões de ovinos PIV, a formação do pró-núcleo foi completada cinco a seis horas após a penetração do espermatozóide. Assim, os ovócitos que possuíam apenas um pró-núcleo nas primeiras 17 horas pós-inseminação, foram considerados como retardatários com baixos índices de fertilização e de produção de embriões devido à queda da penetração dos espermatozoides e falha na ativação em mais de 40% dos ovócitos (MORRIS *et al.*, 2003).

O meio FIV utilizado para a capacitação espermática nos carneiros é adicionado de soro de ovelha em estro, para promover o efluxo do colesterol nos espermatozoides. Posteriormente estes são incubados com os ovócitos por um período de uma a cinco horas, para ocorrer a reação acrossomal. Assim, quando foi utilizado sêmen fresco previamente incubado com soro para indução da capacitação, pode-se observar que metade dos ovócitos foram penetrados após duas à três horas de fertilização. (HUNEAU & CROZET *et al.* 1994). Porém, no sêmen congelado houve alteração na membrana plasmática do espermatozóide que resultou em baixa resistência desta célula por longo período de incubação, demonstrando que o período de uma hora foi suficiente para que ocorresse a capacitação espermática do sêmen congelado ovino, mantendo a viabilidade da célula (GUÉRIN *et al.*, 1992).

Quando 10% de soro de ovelha em estro foi adicionado ao meio SOF para a FIV de cabras e de ovelhas, numa dose inseminante de 1×10^6 espermatozoides/mL incubados em uma atmosfera de 5% CO₂ em ar, e umidade à 39 °C (COGNIÉ *et al.* 2004), verificou-se que quatro horas de incubação no meio FIV foram suficientes para atingirem os índices de clivagem e produção de blastocistos para cabras, no entanto foram necessárias 17 horas de incubação para as ovelhas (COGNIÉ *et al.*, 2003).

Segundo Morris *et al.*, (2003), o aumento do tempo de incubação na FIV, induz ao aumento da poliespermia e à diminuição da formação de blastocistos. Já outro autor (WARD *et al.*, 2002) relatou que o tempo de incubação não influenciou nas taxas de clivagem e na formação de blastocistos. A poliespermia é geralmente associada com a utilização de altas doses inseminantes ou pela disfunção na liberação dos grânulos corticais em oócitos velhos ou imaturos. Assim, Morris *et al.*, (2003) demonstrou que ovelhas que foram fertilizadas *in vitro* com uma concentração espermática de $0,25 \times 10^6$ /mL, resultaram em menores índices de clivagem embrionário *in vitro* e de prenhes *in vivo* (O'MEARA *et al.*, 2005); porém quando

esta concentração espermática foi aumentada 2×10^6 /mL, houve aumento nos índices de clivagem dos ovócitos das ovelhas.

2.4 Produção de embrião *in vitro* (PIV)

A fase do cultivo *in vitro* é a mais longa de toda produção de embrião. Quando os embriões das ovelhas apresentaram-se no estágio de 8 à 16 células, ocorre a ativação genômica que coincide com o aumento da atividade metabólica, síntese de proteína, consumo de O_2 e aumento de carboidratos até o estágio de blastocisto (RIEGER *et al.*, 1992; THOMPSON *et al.*, 1996).

Os embriões produzidos *in vitro* (PIV) possuem qualidade inferior do que os produzidos *in vivo*, havendo diferença entre ambos em relação à morfologia, metabolismo, e expressão gênica. Os embriões produzidos *in vitro* possuem citoplasma mais escuro, baixa densidade, aumento intracelular de triglicérides, presença de blastômeros edemaciados fragilidade na zona pelúcida, diferenças na comunicação intercelular e maior incidência de anormalidade cromossômica (VAM SOOM *et al.*, 1992; NIEMANN & WRENZYCKI, 2000; RIZOS *et al.*, 2002b). Todas estas diferenças, além de resultarem em uma produção inferior dos blastocistos, demonstram maior sensibilidade a crioinjúria, com baixas taxas de prenhes e aumento de anormalidades ao nascimento, como a produção de descendentes maiores dos que originados por embriões produzidos *in vivo* (RIZOS *et al.*, 2002).

Adicionalmente, modificações físicas como alteração do volume celular e da osmolaridade, aumento na incorporação de ácidos graxos em triglicérides e diminuição da incorporação dos ácidos graxos em fosfolipídeos, foram demonstradas nos embriões de PIV (VAM SOOM *et al.*, 1992).

Em bovino, dos 80% dos ovócitos maturados e fertilizados *in vitro* (FIV), e que completaram o primeiro ciclo meiótico culminando com a primeira clivagem para o estágio de duas células, apenas 40 à 50% conseguiram chegar até o estágio de blastocisto. Isto ocorre, pois o a ativação do genoma embrionário influencia na produção dos blastocistos (VAM SOOM *et al.*, 1992). De acordo com Rizo *et al.*, (2002a), a qualidade dos ovócitos submetidos à maturação e posterior fertilização *in vitro*, influencia diretamente a competência oocitária até atingirem o estágio de final de produção embrionária.

Dentre os sistemas de cultivo rotineiramente utilizados para a produção de embrião *in vitro* destaca-se, 1: co-cultivo com a utilização de células somáticas, 2: condições semi-

definidas no meio para ajustar as necessidades do embrião como o meio SOF acrescido de aminoácidos e BSA, ou 3: desenvolvimento *in vivo* de embriões no oviduto (VIVO), 4: condições definidas. (GARDNER e al., 1994). Assim, o método utilizado para o cultivo *in vitro*, pode influenciar o desenvolvimento de embriões em ovelhas (HOLM *et al.*, 1994), e ou bovinos (RIZOS *et al.*, 2002^a).

Segundo COGNIÉ *et al.*, (1999), a adição de soro fetal bovino (F2442; SIGMA), quando adicionada no segundo e quarto dia do cultivo, ou seja, quando foi realizado o “feeding”, melhorou a viabilidade embrionária de ovelhas *in vitro* após a transferência destes para receptoras. Porém, quando o soro de vaca (SINCLAIR *et al.*, 1999) ou de humanos (WALKER *et al.*, 1996) foi suplementado no sistema de co-cultivo ou no meio SOF, houve aumento de fetos nascidos com crescimento aberrante e cordeiros maiores que o normal.

Da mesma forma, De Matos *et al.*, (2002), ao adicionar antioxidantes como a cisteamina, ou íons quelantes como o EDTA (THOMPSON, 2000) ao meio CIV durante o início do desenvolvimento, verificou aumento no desenvolvimento e na qualidade dos embriões. Já Ali *et al.* (2003), quando adicionou cisteamina na FIV ou CIV, observou efeito deletério para a produção embrionário.

2.4.1 Soro

Os componentes do meio de cultivo são os responsáveis pelas mudanças ocasionadas nas características embrionárias no estágio de pré-implantação. A adição de soro no meio de cultivo promoveu influências diferentes dependendo do momento em que este foi adicionado, ou seja, inibiu a clivagem, acelerou o desenvolvimento embrionário e estimulou o desenvolvimento da peri-compactação no final do cultivo (CAROLAN *et al.*, 1995).

Os embriões que foram produzidos *in vitro* na presença de soro demonstraram maior quantidade de grânulos escuros no citoplasma, aumento de gotas lipídicas e um complexo juncional incompleto entre a massa celular interna (MCI) e a trofoderma (HOLM & CALLESEN, 1998), além do aumento na fragmentação celular (THOMPSON *et al.*, 1995). Já os embriões que foram cultivados *in vitro* em meio ausente de soro (mSOF), porém suplementados com albumina sérica bovina (BSA), resultaram em menor quantidade de blastocistos produzidos do que quando o meio CIV foi acrescido de soro (HOLM & CALLESEN, 1998). Estes embriões tenderam a apresentar melhora no desenvolvimento embrionário 168 h após a fertilização em comparação com os que foram cultivados no meio contido apenas de soro, pois a limitada exposição ao soro no meio CIV, induziu a

manifestação de características similares a de embriões produzidos *in vivo* (THOMPSON *et al.*, 1995).

Quando o meio SOF foi acrescido de SFB, tanto as mórulas compactas como os blastocistos, apresentaram-se com grande deposição de lipídeos no citoplasma (CROSIER *et al.*, 2000), verificando que os embriões produzidos pelo sistema de cultivo *in vitro* possuem habilidade em metabolizar o lipídeo através do ATP (FARIN *et al.*, 2000).

Além disso, as mórulas compactas cultivadas *in vitro* no meio presente de soro ou os blastocisto cultivados m meio livre de soro, apresentaram vacúolos que ocuparam o maior espaço do citoplasma do embrião (CROSIER *et al.*, 2000^a), constatando que a mórula compacta quando presente no meio acrescido de soro, pôde inicialmente já estar comprometida, já a mórula compacta que foi cultivada no meio livre de soro, demonstrou aumento no desenvolvimento para o estágio de blastocisto (FAIR *et al.*, 2000).

2.5 HIPÓTESE

A hipótese prevista para este estudo é que o grupo 2 e o grupo 4, ambos acrescido com 100 µM de cisteamina, devem ser superiores ao grupo 1 e o grupo 3 que não possuem adição do antioxidante.

3. OBJETIVO

A presente investigação experimental objetivou utilizando-se:

1- Avaliar qualitativamente o efeito da adição do Soro Fetal bovino (SFB), e da Albumina Sérica Bovina (BSA) associada ou não a cisteamina na maturação nuclear através da presença da metáfase II nos ovócitos de ovelhas

2- Avaliar quantitativamente o protocolo de maturação que obteve melhores taxas de ovócitos em metáfase II (MII) nos índices de produção de embriões ovinos *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Obtenção e maturação dos ovócitos

Os ovócitos colhidos foram provenientes de ovários de abatedouro da cidade de São Manuel, na região Centro-Oeste do Estado de São Paulo e transportados em recipiente térmico contendo solução salina estéril e mantidos à temperatura de 30-35°C. No laboratório, estes foram novamente lavados com solução salina estéril aquecida a 30-35°C e todos os folículos ovarianos foram aspirados manualmente utilizando agulha 30x8 G acoplada a uma seringa descartável de 20 mL descritos na Figura 1.



FIGURA 1: A: Imagem digital, A: Lavagem dos ovários de ovelhas; B: Controle da temperatura em 36°C para os ovários e o líquido folicular; C: Aspectos dos ovários de ovelhas; D: Aspiração *in vitro* dos folículos de ovários de ovelhas.

O fluido folicular aspirado e os ovócitos foram transferidos para um tubo de poliestireno de 50 mL. Ao término da aspiração, o sedimento formado descrito na Figura 2, foi distribuído em placas de poliestireno de 60 mm de diâmetro, procedendo-se então à seleção dos ovócitos em microscópio estereoscópico, sendo selecionados somente aqueles que apresentavam aspecto homogêneo do citoplasma, compactação das células do *cumulus*, e pelo menos uma a três camadas de células de revestimento como descrito na Figura 3.



FIGURA 2: Imagem Digital: Aspecto do sedimento contendo os ovócitos de ovinos aspirados

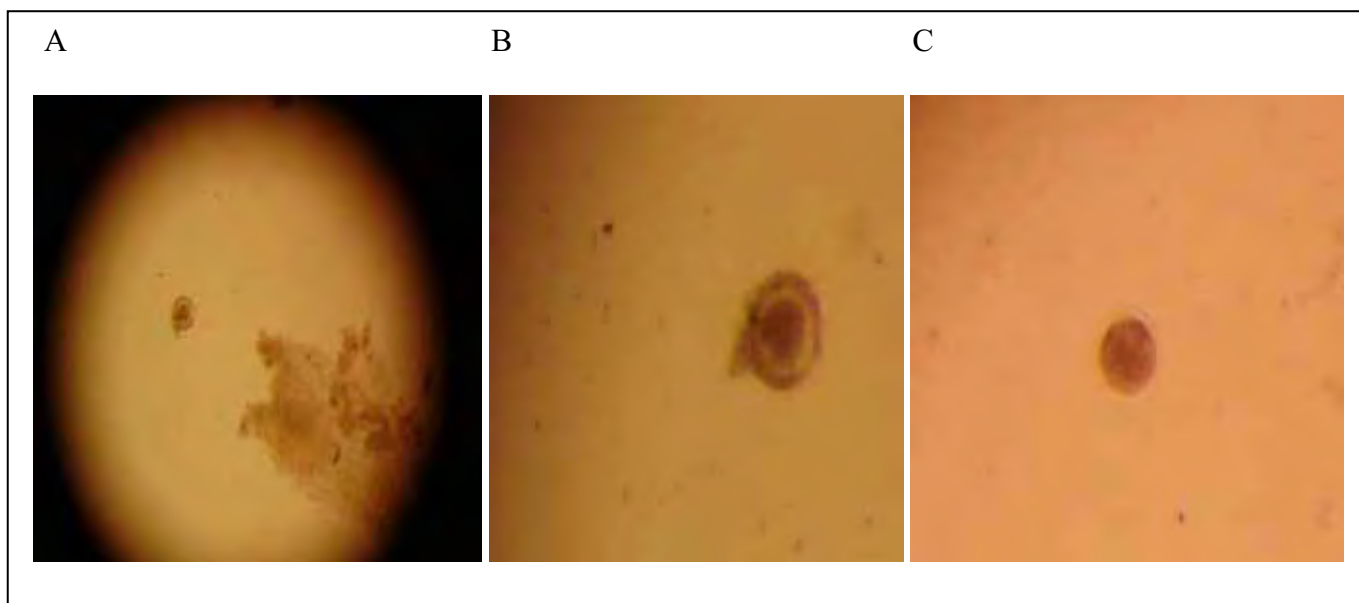


FIGURA 3: A e B: Aspectos dos ovócitos de ovelhas aspirados e selecionados Grau III; C: Aspecto ovócito de ovelha desnudo.

Os ovócitos selecionados foram lavados duas vezes em meio TCM-199 contendo tampão Hepes, suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB), 0,3 mM de piruvato e 75µg/mL de estreptomicina e uma vez em meio de maturação (TCM-199, 10% soro fetal bovino (SFB), 0,3 mM de piruvato e 75µg/mL de estreptomicina, 0,1 UI/mL de hCG, 1µg/mL de estradiol), básico para todos os tratamentos segundo Accardo *et al.*, 2004.

Em seguida, os ovócitos foram transferidos para placas “four well” (20 ovócitos/poço) para o cultivo da maturação *in vitro* como descrito na Figura 5. O meio de maturação além de conter a suplementação básica para todos os tratamentos, recebeu a complementação específica para cada tratamento, sendo que foram utilizados 20 ovócitos por grupo, com 5 repetições em cada grupo seguintes:

- Tratamento 1: Soro Fetal Bovino (SFB) (10%)
- Tratamento 2: SFB (10%) + cisteamina (100µM)
- Tratamento 3: BSA (Albumina Sérica Bovina)(4mg/ml)
- Tratamento 4: BSA (4mg/ml) + cisteamina (100µM)

O cultivo dos ovócitos para maturação *in vitro* foi realizado em estufa da marca Thermo a 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar num período de 20-22 horas segundo, Accardo *et al.*, (2004); Ptak *et al.*, (2002).

Para a realização da primeira etapa do experimento foi selecionado o melhor protocolo da maturação oocitária *in vitro*. Na segunda etapa do experimento foi realizada a fertilização *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV), para então se proceder a análise dos índices de embriões ovinos produzidos *in vitro* no oitavo dia (D8) do desenvolvimento.

4.2. – Avaliação da maturação nuclear

Os ovócitos foram retirados do meio de maturação e colocados na enzima hialuronidase (2mg/ml) por dois minutos para extração das células da granulosa, através de pipetagens sucessivas. Posteriormente os ovócitos desnudos foram coradas com Hoescht 33342 e realizada a montagem das lâminas com lamínulas. Após a coloração das células, estas foram avaliadas conforme a configuração nuclear utilizando-se microscopia de epifluorescência (340-380 nm) (Leica DMIRB) com luz ultra-violeta. Os ovócitos foram classificados segundo o estágio meiótico em: VG (Vesícula germinativa), QVG (quebra da

vesícula germinativa), MI (metáfase I); MII (metáfase II); e NI (Não identificado ou degenerado) (Bayard *et al.*, 2002) como descrito na Figura 6.

Num total de 400 ovócitos que foram divididos aleatoriamente em cada tratamento, foi analisada a maturação nuclear de acordo com a condensação da cromatina, ou seja, o ovócito que estava na fase de metáfase II (MII), havendo extrusão do 1º corpúsculo polar, indicativo de maturidade do ovócito, ou se este estava imaturo, apresentando-se em outros estágios meióticos como em: vesícula germinativa (VG), quebra da vesícula germinativa (GVBD), metáfase I (MI) (Accardo *et al.*, 2004).

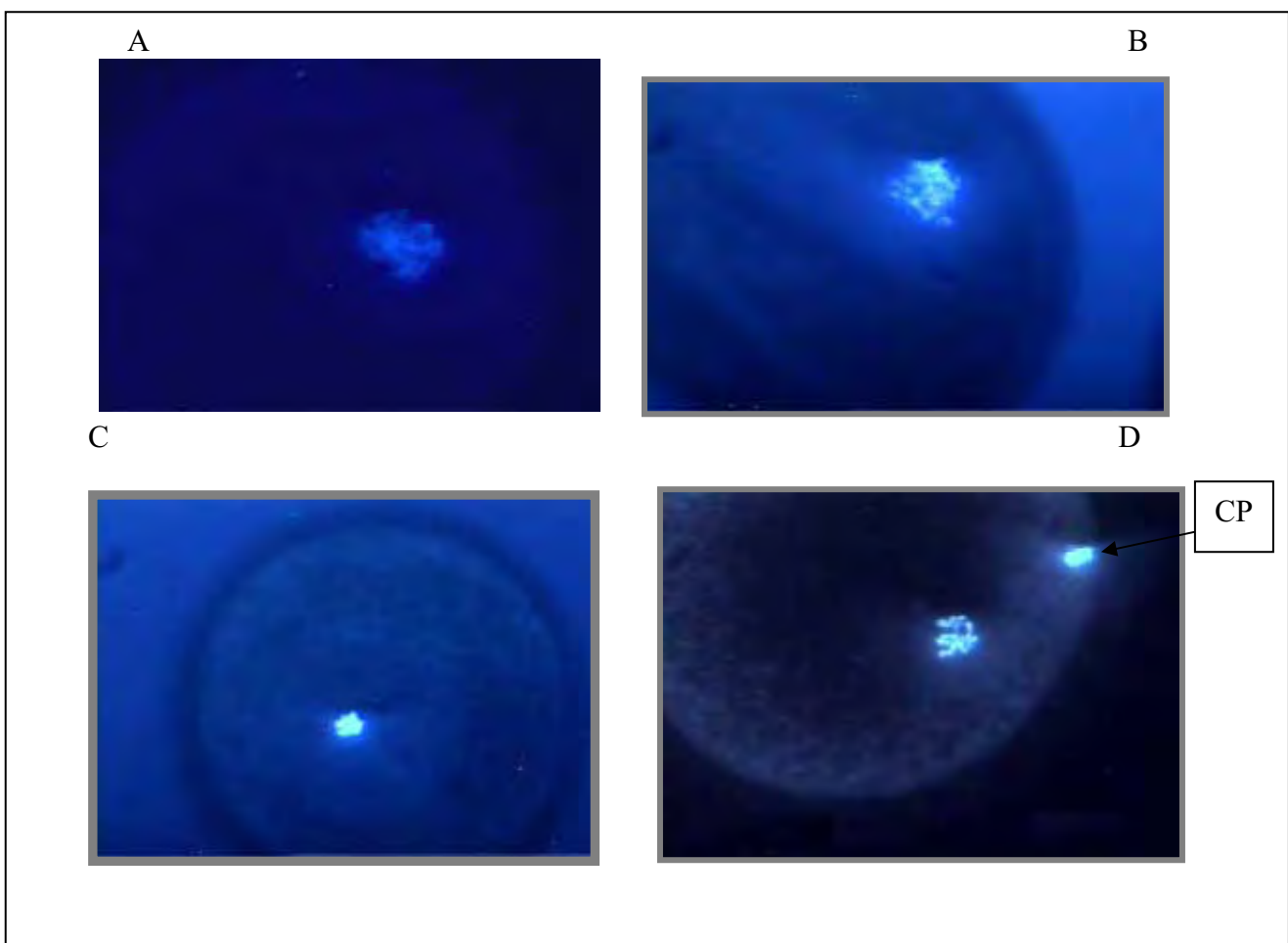


FIGURA 6: Micrografia Digital mostrando os aspectos da morfologia nuclear em ovócitos corados com Hoescht: A:VG; B: QVG, C: MI; D: MII com extrusão do Corpúsculo Polar (CP)

4.3 - Fecundação dos ovócitos

A fecundação *in vitro* (FIV) foi realizada 20-22 horas após o início da MIV. Os ovócitos foram transferidos, em grupos de 15 a 25, para poços de 100 µL de meio TALP, contido de SOF bicarbonato (40mL), glutamina (6mg), estreptomicina (4mg) suplementado com 20% de soro de ovelha em estro inativado, cobertas com óleo mineral. O sêmen utilizado foi de apenas um carneiro, que foi congelado em palhetas de 0,5 mL. Para a descongelação foi aquecido a 45°C por 20 segundos e depositado em eppendorf. Posteriormente foi centrifugada uma vez a 200g por 5 min para “lavagem do sêmen” para a retirada do diluidor. O sedimento foi recuperado e depositado em outro eppendorf contendo meio TALP. Posteriormente foi homogeneizado e submetido a avaliação quanto ao volume, concentração e motilidade espermática. A concentração final foi ajustada para 25×10^6 espermatozoides vivos/mL com meio TALP como descrito na Figura 7 e adicionados às gotas de meio já contendo os ovócitos.

O período de co-incubação de ovócitos e espermatozoides, a 38,5-39°C e 5% de CO₂ em ar, foi de 17-18 horas para a produção de embriões segundo, Ptak *et al.*, (2002); Radziewicz & Brown, (1998). Após esse período, as células do *cumulus* foram removidas do meio FIV TALP e desnudas por pipetagem.

4.4 - Produção de embriões *in vitro*

Após fecundação, os zigotos foram lavados por três vezes no meio de lavagem FIV e uma última vez em meio SOF, suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais, 1 mM de glutamina e 8 mg/ml de albumina sérica bovina (BSA) a 7% O₂, 5% CO₂ e 88% de N₂ a 39°C de atmosfera cultivados em microgotas de 100 µl sob óleo mineral. No terceiro e no quinto dia de cultivo, considerando o dia zero (D0) foi definido como o dia da fertilização, foi realizado o “*feeding*”, adicionando 10% de soro fetal bovino ao meio, realizando o até o término do cultivo no sétimo dia (D7). A clivagem foi avaliada 40 horas após a fecundação e o desenvolvimento de blastocistos expandidos no oitavo dia (D8) segundo Accardo *et al.*, (2004); Ptak *et al.*, (2002), como descritos na Figura 9.

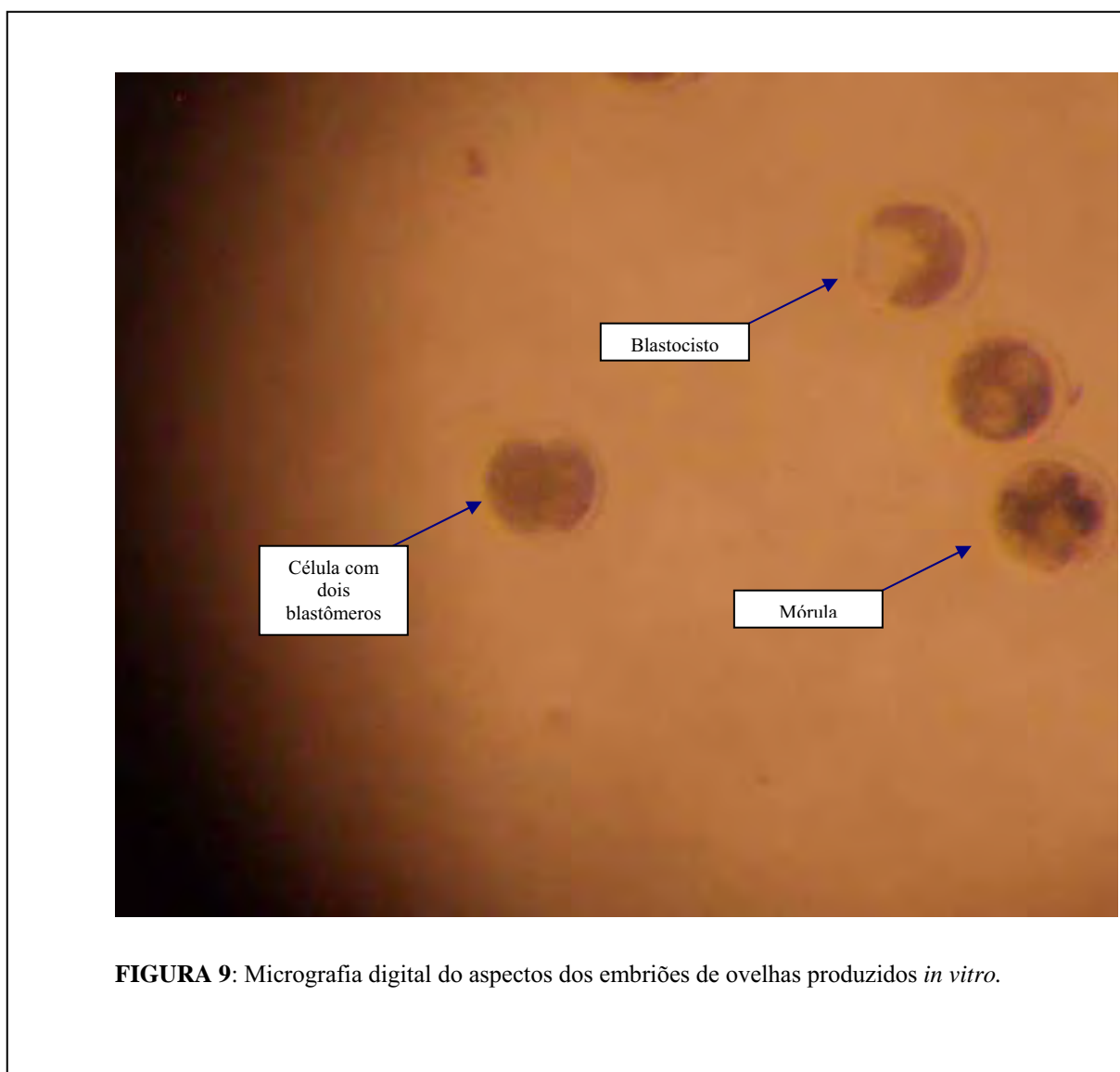


FIGURA 9: Micrografia digital do aspectos dos embriões de ovelhas produzidos *in vitro*.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa “*Statistical Analysis System*” (SAS), versão 5.0 (1996) (Procedimento MEANS e GLM com $P < 0,05$). Na primeira etapa do experimento, os grupos de ovócitos maturados foram analisados utilizando o teste Qui-Quadrado para a comparação da proporção de células que atingiram a fase de metáfase II (MII) nos quatro tratamentos.

Na segunda etapa foram computados a proporção média de produção de mórulas e blastocistos com seus respectivos erros padrões.

5. Resultados e Discussão

A eficácia de diferentes meios de maturação *in vitro* (MIV) no desenvolvimento embrionário tem sido alvo de intensa discussão na literatura e objeto de inúmeros ensaios comparativos. Com esse intuito, o presente estudo inicialmente avaliou ovócitos ovinos cultivados em quatro suplementações distintas, a saber: (G1) Soro Bovino Fetal (SBF), (G2) SBF e Cisteamina, (G3) Albumina Sérica Bovina (BSA) e (G4) BSA e Cisteamina, sendo a eficácia do meio mensurada através do número de ovócitos em estágio de metáfase II (MII). Os resultados encontrados estão sumarizados na Tabela 01.

Tabela 01 – Dados de avaliação quantitativa da eficácia dos meios de maturação nuclear.

Grupo	Vesícula Germinativa	Quebra da Vesícula Germinativa	Metáfase I	Metáfase II	Não Identificado (ND)	Total	Percentual de Metáfase II
G1	23	40	20	16	1	100	16% ^b
G2	13	27	20	34	6	100	34% ^a
G3	8	32	26	28	6	100	28% ^{a,b}
G4	5	40	17	33	5	100	33% ^a
Hipótese		Estatística			Significância		
G2=G4 > G1 = G3		$\chi^2 = 33,17$			p = 0,001		

Legenda: G1-Soro fetal bovino (SFB) (10%); G2-SFB (10%) + cisteamina (100µM); G3-BSA (Albumina Sérica Bovina) (4mg/ml); G4-BSA (4mg/ml) + cisteamina (100µM);(ND) Não identificados ou degenerados

Avaliando o percentual de ovócitos que atingiram a MII, foi observado no grupo 2 (SFB + cisteamina) a melhor taxa de 34%, semelhante ao observado no grupo 4 (BSA + cisteamina) com 33%, e no grupo 3 (BSA) com 28%, mas diferindo do grupo 1 (SBF) com apenas 16%. A análise estatística mostrou inferioridade de G1 também em relação ao G2 e G4, com diferença significativa ($p < 0,05$). Já o grupo 3 se posicionou como intermediário, sendo estatisticamente semelhante aos grupos 2 e 4, mas também comparável ao grupo 1.

Em última análise, apesar do benefício encontrado nos grupos com suplementação de cisteamina, os resultados de maturação foram inferiores quando comparados aos usualmente descritos na literatura de bovinos, e possivelmente esse fato se deva a fatores como a conservação do material, variação na faixa etária e condição reprodutiva dos animais, diferentes estações do ano, e alteração das características morfológicas foliculares, levando também em consideração a qualidade dos ovócitos desta espécie.

Deste modo, foram utilizados quatro tratamentos com diferentes suplementações para o meio MIV de ovelhas, sendo que, em dois desses, foi adicionado o antioxidante cisteamina, ora na presença de SFB, ora com BSA. Nos grupos em que a cisteamina esteve presente, foram encontradas maiores taxas de ovócitos que atingiram o estágio de MII, etapa fundamental da MIV, pois nela acontece a maturação necessária para que ocorra os próximos eventos da fertilização e do cultivo *in vitro*. Esses resultados foram semelhantes aos de outros autores (DE MATOS *et al*, 2002), que utilizaram 100 μ M de cisteamina no meio MIV de ovelhas, verificando efeito benéfico na maturação oocitária. Outros resultados divergem desses achados, mas há consenso que influências intrínsecas e extrínsecas podem tanto ajudar na progressão meiótica do ovócito, quanto no bloqueio do mesmo (KRISHER & BAVISTER, 1998).

5.1.1 Obtenção de ovários e ovócitos

Os ovários foram obtidos de abatedouros da cidade de São Manuel, na região Centro-Oeste do Estado de São Paulo, e apesar da pequena distância do Laboratório de Reprodução Animal da FMVZ - UNESP - Botucatu, local de realização dos testes, e deste material não ter sofrido condições de estresse pelo tempo de armazenagem, houve, em muitas rotinas, problemas na estocagem dos ovários que podem ter influenciado negativamente na maturação dos ovócitos. Pelo protocolo estabelecido, os ovários deveriam ser estocados em solução fisiológica à 36°C em garrafa térmica para conservação das células, porém as regras dos estabelecimentos não permitiam a entrada dos pesquisadores na linha de abate, dificultando o controle de temperatura, visto que o material foi coletado pelos funcionários do local.

Além disso, houve dificuldade para a obtenção de ovários de ovelhas, fazendo com que as rotinas fossem realizadas em momentos distintos, ocasionando heterogeneidade em variáveis como a época sazonal, faixa etária, condições corporais e estágios reprodutivos dos animais. Possivelmente estes fatores influenciaram diretamente na qualidade oocitária em relação a maturação *in vitro*, pois estudos apontam que a competência oocitária é adquirida

durante a foliculogênese e afetada por diversos fatores, como estação do ano tamanho do folículo estresse, nutrição, sanidade e idade do animal (LONERGAN *et al.*, 1994; MORTON *et al.*, 2005).

Para obtenção dos ovócitos no presente estudo, foram aspirados ovários com seringa de 10 ml e agulha 21G (30x8 mm), gerando média subjetiva de um a dois ovócitos por ovário, número relativamente baixo para a realização da técnica de Produção de Embrião *In Vitro* (PIV). Já no estudo de Morton *et al.* (2005), os maiores índices de recuperação ovocitária ocorreram quando se utilizou seringa de 2,5 ml com agulhas de 19 ou 20 G.

Em frigoríficos, o abate dos carneiros normalmente é realizado em animais de três a quatro meses de idade, para a obtenção da carne de cordeiro, e no caso das fêmeas, geralmente são as que possuem idade avançada não servindo mais para reprodução sendo destinadas para o descarte. Isso explica, em tese, os índices de maturação *in vitro* neste experimento inferiores aos encontrados em bovinos, visto que, provavelmente, os ovários obtidos eram de animais pré-púberes ou senis, fato este que influencia diretamente a qualidade oocitária. Em estudo com ovócitos obtidos de animais dessa faixa etária O'Brien *et al.*, (1997) constataram que houve menor metabolismo da glutamina, menor número de mitocôndrias e menor tamanho dos grânulos corticais, além das limitações funcionais como diminuição do tamanho, defeito na ligação das células do *cumulus* com os ovócitos, decréscimo de aminoácidos, redução da síntese de proteínas e do metabolismo energético, anormalidade da atividade do ciclo celular e na regulação do MPF durante a meiose nos ovócitos. Segundo estudo de Ledda *et al.*, (1997), estes defeitos estão associados a um aumento na incidência de partenogênese, migração irregular dos grânulos corticais, maturação citoplasmática e nuclear inadequada, além do aumento da polispermia.

Outro fator que pode ter prejudicado a maturação nuclear dos ovócitos neste experimento é a característica morfológica do folículo. Como houve escassez de ovários de ovelhas abatidos e, conseqüentemente, de ovócitos (média subjetiva de um a dois ovócitos por ovário), foi optado pela aspiração de todos os folículos e padronizado a seleção oocitária. Desta forma, ao longo destes dois anos os ovários ora se apresentavam repletos de folículos na superfície ovariana, ora com escassez do mesmo, variando a população ovocitária, fator que pode ter influenciado a maturação nuclear destas células. E adicionalmente, como já discutido, a competência oocitária é adquirida durante a foliculogênese e afetada por diversos fatores, como estação do ano, tamanho do folículo, estresse, nutrição, sanidade e idade do animal.

Outro aspecto que pode ter influenciado na qualidade ovocitária foi a aspiração tanto de folículos menores, quanto de maiores, recuperando grandes quantidades de ovócitos Grau

III e Desnudo, prejudicando a quantidade de células utilizadas e a qualidade para ocorrer a maturação nuclear. Esses achados foram descritos em outros estudos (LEDDA *et al.*, 1997, 1999) em que ovócitos obtidos de folículos pequenos (1-2mm), demonstraram diâmetro menor, e falharam em completar a meiose *in vitro*, pois o tamanho do folículo afetou a ligação entre as células do *cumulus* e o ovócito, devido ao crescimento incompleto destes. Já os ovócitos de ovelhas, aspirados de ovários que continham quantidade de folículos inferior a quatro, demonstraram baixo índice de clivagem e de produção de blastocistos, em relação aos que continham oito ou mais folículos (MOSSA *et al.*, 2007).

A presença desses fatores, que potencialmente influenciam a qualidade oocitária, pode estar relacionada com a grande variabilidade na qualidade ovocitária encontrada no presente experimento. Foram obtidos desde ovócitos mais circunscritos pelas células do *cumulus* (Grau I, II), até aqueles com menor camadas de células do *cumulus* (Grau III, Desnudo e Degenerados), encontrados com maior frequência na rotina da PIV deste estudo. Adicionalmente, por característica individual da espécie estudada, os Graus I e II podem estar naturalmente em menor quantidade.

Esses achados também são descritos em outros trabalhos, e em diversas espécies, como ovinos (STAIGMILLER AND MOOR, 1984); suínos (YAMAUCHI AND NAGAI, 1999) e bovinos (CHIAN *et al.*, 1994; GESHI *et al.*, 2000), em que os ovócitos desnudos demonstraram maior susceptibilidade ao estresse oxidativo e à precocidade na degeneração celular, diferentemente dos que estavam envoltos por várias camadas de células do *cumulus*, que ajudaram tanto na neutralização dos radicais presentes nos sistemas *in vitro*, como em um aumento nos índices de clivagem. Apesar de alguns ovócitos demonstrarem células do *cumulus* diminuídas ou ausentes (DOS), estes conseguiram completar a maturação meiótica *in vitro*, porém com uma competência diminuída (CHIAN *et al.*, 1994).

Segundo estudo de Feugang *et al.*, 2004, o sistema *in vitro* influencia diretamente o ovócito por haver aumento das concentrações intracelulares de Radicais livres (ROS) quando as células são expostas a altas tensões de oxigênio, provocando injúria na célula. Desta forma, no presente estudo foi optado pela utilização de 100 μ M de cisteamina, já descrita como eficiente na MIV de ovelhas por De Matos *et al.*, 2002, com a função de neutralizar os radicais, principalmente dos ovócitos que possuíam células do *cumulus* diminuídas ou ausente. Esses foram os tipos celulares encontrados com maior frequência no presente estudo, numa análise subjetiva.

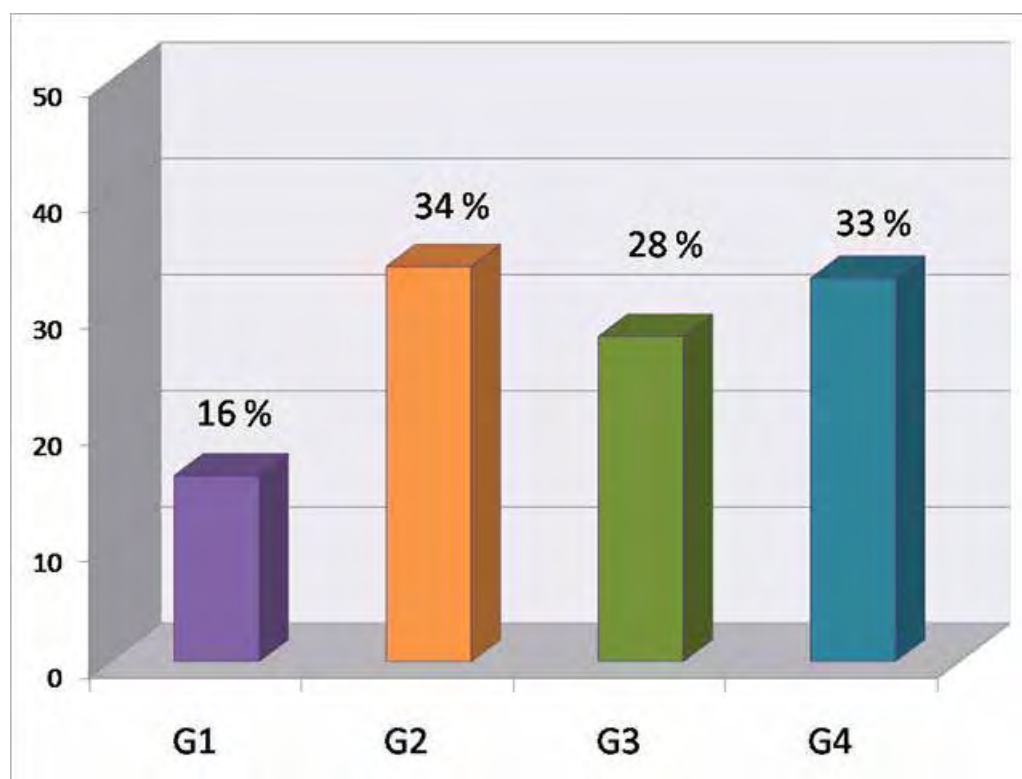
Para avaliação da maturação *in vitro* foi escolhido a nuclear, utilizando o corante Hoscht para o material nucléico presente no ovócito. Trabalhos demonstram que a suplementação do meio MIV com os precursores da síntese de glutatona (GSH) intracelular,

como o β -mercaptoetanol, cisteamina ou a cisteína na espécie bovina (AVELINO, 2004), ovina (DE MATOS et al., 2002b), caprina (RODRIGÉZ-GONZÁLEZ et al., 2003), demonstraram aumento da síntese de GSH, proporcionando maior competência dos ovócitos e melhora nas taxas de desenvolvimento embrionário no estágio de blastocistos.

No presente estudo, apesar da taxa de ovócitos que atingiram o estágio de MII ter sido maior nos grupos suplementados por cisteamina, sejam associados com BSA ou SFB, estes resultados foram considerados baixos. Para explicar esses achados, uma possível linha teórica é a de Edwards (1965) apud Abeydeera *et al.* (1998), em que ovócitos removidos dos folículos e mantidos em condições favoráveis de cultivo *in vitro*, podem apresentar maturação nuclear espontânea (retomada da meiose até o estágio de MII), mas, algumas vezes, este reinício acaba sendo precoce, e o ovócito ainda não está apto para ser maturado, fertilizado e se desenvolver (HYTTEL *et al.*, 1997; HENDRIKSON *et al.*, 2000).

Neste experimento o percentual de MII do Grupo 1, foi numericamente distinto do Grupo 3, como descrito no gráfico 1, porém eles não diferiram estatisticamente, e provavelmente esse resultado seja decorrente de número insuficiente de ovócitos em cada grupo (5 repetições de cada grupo com 20 ovócitos), para evidenciar e gerar uma provável diferença na análise estatística.

FIGURA 10: Gráfico da porcentagem ovócitos que atingiram fase de metáfase II (MII) através da análise da maturação nuclear nos 4 distintos tratamentos na MIV.



Legenda: G1-Soro fetal bovino (SFB) (10%); G2-SFB (10%) + cisteamina (100 μ M); G3-BSA (Albumina Sérica Bovina) (4mg/ml); G4-BSA (4mg/ml) + cisteamina (100 μ M).

5.2 . Fertilização *in vitro*

Apesar da etapa da MIV ser a mais importante nos procedimentos de PIV, para o ovócito tornar-se maduro e ter a capacidade de ser fertilizado, a FIV, para a espécie ovina, demonstrou diversas dificuldades. Inicialmente, não foi possível utilizar o mesmo protocolo de bovinos descrito pela literatura para os ovinos, devido às diferenças individuais entre espermatozoides das diferentes espécies. Além disso, a literatura não especifica detalhadamente a composição do meio e do procedimento adequado, tanto para preparação do sêmen desde o método de congelação, quanto para o cultivo da etapa da FIV em estufa.

No presente estudo, foi verificada subjetivamente a queda na motilidade e na concentração espermática após a descongelação seguida da centrifugação. Foi observado que a potência de centrifugação utilizada para ovinos necessitou de modificações, como a redução para 200g por 5 minutos, pois o aumento desta, provocou queda da motilidade espermática

dos carneiros e possivelmente lesão na membrana das células. Esses achados condizem com Cox *et al.*, (2007), que ao centrifugar o sêmen de carneiro com a mesma potência usualmente realizada na FIV de bovinos (900g /30 minutos), observou grande queda na motilidade espermática.

Desta forma, foi optado pela “lavagem” do sêmen de carneiros descongelado para retirada do diluidor, já que ao ser testada a metodologia do gradiente de Percoll, foi observado comprometimento da motilidade espermática, que se apresentou em torno de 60% pós-descongelação e imediatamente caiu para 20 ou 10%, comprometendo a posterior fertilização. Essas dificuldades não foram encontradas por outros autores (COGNIÉ *et al* 2004,) que relatam que a centrifugação do sêmen pelo gradiente de Percoll é superior aos outros procedimentos de separação dos espermatozóides ovinos, quando utilizadas palhetas congeladas.

Este fato supostamente ocorreu, devido a utilização do sêmen congelado para a realização da FIV, pois comercialmente trata-se de uma ferramenta mais viável em relação a disponibilidade da amostra, além de utilização mais rentável do tempo para a realização da fertilização no momento adequado (22-24horas pós MIV) do que o uso do sêmen fresco. Porém, segundo a literatura (HUNEAU *et al.*, 1994) tanto nos sistemas *in vivo* quanto *in vitro*, normalmente ocorrem diferenças nos índices de fertilidade entre os carneiros que limitam a seleção comercial de machos, tanto para a utilização na inseminação artificial, como para a implementação de tecnologias como a produção de embriões *in vitro* (PIV).

Alguns estudos relacionaram estas diferenças de motilidade e fecundação entre os carneiros utilizados, porém não entre os ejaculados do mesmo animal (SMITH *et al.*, 1997). Já outros trabalhos (WINDSOR, 1997; SMITH *et al.*, 1996), divergem dessa premissa, e apontam que a simples seleção do sêmen elimina as diferenças entre os carneiros em relação a motilidade. Porém, a variabilidade de cada ejaculado entre mesmo carneiro permanece, e as diferenças de fertilidade podem ocorrer entre carneiros e entre ejaculados de um mesmo carneiro

No presente trabalho, a congelação do sêmen foi realizada com glicina, gema e leite para a realização da FIV, fato este que pode ter comprometido tanto a qualidade espermática, quanto a fertilização dos ovócitos, pois a congelação e a descongelação do sêmen induzem modificações na estrutura lipídica e protéica da membrana plasmática, promovendo a capacitação e a reação precoce do acrossoma (SALAMON & MAXWELL, 2001). Especificamente no caso dos ovinos, o uso do sêmen congelado promove a redução da capacidade fecundante dos espermatozóides em relação ao sêmen fresco, e, de acordo com estes achados, (SALAMON & MAXWELL, 2001). verificaram que de todos espermatozóides

criopreservados, 40-50% não sobrevivem, por haver modificações bioquímicas, funcionais e estruturais na membrana plasmática da célula, permanecendo apenas uma sub-população de espermatozóides viáveis.

O processo de refrigeração, congelação e descongelação do sêmen, antecipam a capacitação e a reação acrossomal dos espermatozóides em comparação ao sêmen *in natura*, tornando sua sobrevivência limitada, pois os espermatozóides capacitados não possuem um período de vida prolongado, pois são ativados para preparação de encontro com o ovócito, e se isto não ocorrer em curto tempo eles morrem (WATSON, 1995).

Além disso, a população espermática pós-descongelação é muito frágil, tendendo a desenvolver uma reação acrossomal espontânea e, especificamente, no caso de espermatozóides ovinos, tendem a apresentar uma capacitação espermática mais rápida que as demais espécies. No presente estudo, através de testes, foi verificado que qualquer adição de algum suplemento capacitante como a heparina no meio FIV foi maléfico para a sobrevivência espermática ovina, apesar de ser usualmente utilizado na FIV de bovinos, como já descrito por Morris *et al.*, (2003).

Outro fator que pode supostamente ter influenciado a população espermática ovina do presente estudo, e a posterior fertilização dos ovócitos, é a composição dos diluidores e crioprotetores, pois segundo a literatura, altas concentrações de crioprotetores são tóxicas para a célula, podendo resultar na queda da fertilidade (SALAMON & MAXWELL, 2001).

Dattena *et al.* (2000), ao coletar 390 ovócitos provenientes de abatedouro, verificaram que 63 (22,4%) se desenvolveram até o estágio de blastocisto. Apesar da clivagem ter sido alta, os autores utilizaram sêmen fresco, o que inviabilizou a técnica a campo, já que para realizar a fertilização *in vitro*, há a necessidade desta ser realizada no momento exato 22-24 horas pós-maturação *in vitro* (MIV). Corroborando com esta hipótese, Fukui *et al.* (1988) utilizaram sêmen fresco e Morris *et al.* (1998), sêmen congelado, demonstrando que as características individuais da espécie ovina por si só podem afetar tantos os índices de fertilização *in vitro*, como a habilidade de clivagem do ovócito para o desenvolvimento do blastocisto.

No presente estudo, por ter ocorrido queda da motilidade espermática em todas as rotinas de FIV, optamos pela utilização de dose inseminante correspondendo a 25×10^6 espermatozóides por ovócito, que vão de acordo com o descrito por O'Meara *et al.*, (2005). Apesar de estudos prévios relatarem que a concentração de sêmen utilizada pode afetar os índices de clivagem *in vitro* dos embriões, Morris *et al.* (2003), demonstrou que a FIV de ovelha com uma baixa concentração espermática de $0,25 \times 10^6$ mL, resultou em baixos índices de clivagem embrionário *in vitro* e de prenhes *in vivo*. Esses achados diferem dos

descritos por Hunter *et al.* (1993), que apontam a baixa concentração do sêmen como melhora nas diferenças entre carneiros no sistema de fertilização *in vitro*, pois poucos espermatozóides que foram adicionados nos ovócitos, refletiram uma situação *in vivo* com menor quantidade desses presentes nos sítios de fertilização. Porém, não foi relatada a dose inseminante utilizada.

No experimento realizado, os espermatozóides foram fertilizados e incubados por um período de 17-18 horas em estufa com 5% CO₂ e temperatura de 38°C, sendo verificadas baixas taxas de clivagem, diferindo de outros estudos, em que as células foram fertilizadas *in vitro* num sistema cultivado em uma atmosfera controlada com 5% O₂, e com maior efetividade para a produção de blastocistos (LEONI *et al.*, 2007).

O passo seguinte foi adicionar soro de ovelha em estro no meio FIV, de acordo com Cognié & Baril, (2003), para poder suportar a capacitação espermática e ou a fertilização. Apesar de ainda não ser bem conhecida a constituição do soro, este apresentou resultados satisfatórios bem como quando substituído por moléculas que estimulam a capacitação espermática, como a hipotaurina e ou a epinefrina e ou o BSA (GORDON, 1994). Porém, em concordância com Cognié & Baril, (2003), o mesmo não ocorreu com a adição da heparina, que é um potente ativador da capacitação espermática no touro, não agindo de forma eficaz na capacitação do espermatozóide ovino. Outros estudos, porém, mostraram que a heparina quando adicionada no meio de capacitação de sêmen ovino, apresentou 65,8% de ovócitos fecundados (NAQVI *et al.* 2001). Já a cafeína deprimiu as taxas de fecundação em sêmen fresco, além de possuir um sinergismo com a heparina que afetou negativamente as taxas de clivagem nesta espécie (NAQVI & MADAN, 1997). Estas diferenças se devem ao fato dos espermatozóides dos pequenos ruminantes serem maiores que dos touros e manterem suas particularidades (COGNIÉ & BARIL, 2003).

5.3. Produção de embrião *in vitro*

O objetivo desta etapa foi avaliar o comportamento do meio de melhor desempenho de MIV obtido entre o G1, G2, G3 e G4, analisados na primeira etapa, com relação a sua eficiência em melhorar a quantidade (clivagem e produção de blastocistos), avaliando os índices de produção embrionária *in vitro* na espécie ovina.

Dessa forma, foi optado para utilização o meio utilizado pelo Grupo 2, com melhor desempenho numérico, constituído por SFB (10%) + cisteamina (100µM). Após esse tratamento, 1023 ovócitos de todas as repetições foram fertilizados *in vitro* nas mesmas condições e com o sêmen de um mesmo carneiro, congeladas com o mesmo diluidor,

constituído de glicina, gema e leite. Após 17 a 18 horas do cultivo da FIV; de acordo com a metodologia descrita por Cognié *et al.*, (2004), os prováveis zigotos foram encaminhados para o meio de cultivo *in vitro* (CIV) composto por SOF, acrescido de aminoácidos essenciais, não essenciais, glutamina, antibiótico, piruvato e BSA e glicose, e então incubados em estufa de gás controlado com 5% de O₂. A adição de glicose foi essencial no meio CIV de ovelhas, pois apesar de haver diferenças entre a espécie bovina e ovina em relação aos requerimentos energéticos até o estágio de blastocisto, houve a necessidade da suplementação com glicose (principal fonte de energia) para reduzir o estresse celular após a compactação na PIV de ovelhas. (COX *et al.*, 2007).

Após 24 e 48 horas de CIV, foi realizada a troca do meio, adicionando-se SFB para realização do “*feeding*”. Apesar dos baixos índices de produção de embriões ovinos *in vitro*, essa etapa se demonstrou satisfatória, pois em análise subjetiva do experimento piloto anteriormente realizado, quando o soro não era readicionado no meio CIV, as taxas de clivagem não ocorreram. Os mesmos achados foram demonstrados por Cognié *et al.*, (1999) em que a adição do SFB melhorou a viabilidade embrionária *in vitro* nas ovelhas, e também por outros autores (PIYOPUMMINTR & BAVISTER, 1994), que descreveram a suplementação do soro no meio de cultivo como benéfica, pois promoveu diferentes influências no momento em que foi adicionado, acelerando o desenvolvimento embrionário e ou estimulando o desenvolvimento da peri-compactação (CAROLAN *et al.*, 1995).

Para a realização do “*feeding*”, retiramos 50µL do meio contido na placa e readicionamos 50µL de um novo meio, com a presença apenas de 25 µL/mL de SFB. Apesar de ter sido benéfica a clivagem nos zigotos, estes dados divergiram de outros estudos, em que embriões produzidos *in vitro* na presença de soro, demonstraram maiores quantidades de grânulos escuros no citoplasma, aumento de gotas lipídicas, complexo juncional incompleto entre a massa celular interna (MCI) e a trofoderma (HOLM & CALLESEN, 1998), constatando que grande quantidade de soro adicionado no meio de cultivo *in vitro*, resultou em aumento na fragmentação da célula e diminuição da produção embrionária (THOMPSON *et al.*, 1995).

Entretanto, embriões que foram cultivados *in vitro* em meio ausente de soro (mSOF), porém suplementados com albumina sérica bovina (BSA), resultaram em menor quantidade de blastocistos do que o meio CIV acrescido de soro (CROSIER & FARIN, 1998a). Porém, estes embriões tiveram tendência a melhorar o desenvolvimento embrionário nas 168 horas após a fertilização, em comparação aos que foram cultivados no meio contendo apenas de soro, corroborando com os achados de Thompson *et al.*, (1995), em que a limitada exposição

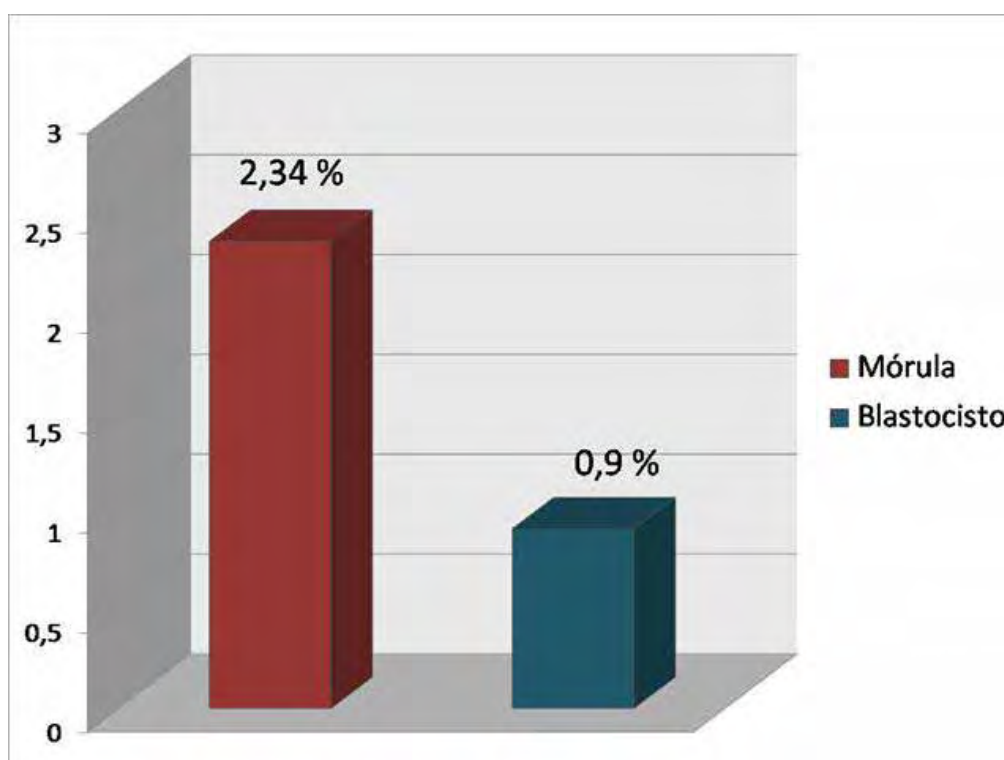
do soro no meio CIV, manifestou características similares com os embriões produzidos *in vivo*.

Estas condições foram mantidas em todas as repetições do experimento, e, segundo Ledda *et al.*, 1997, as diferenças nas condições de PIV (composição dos meios de cultivo e qualidade espermática) têm impacto sobre todas as etapas (MIV, FIV e CIV).

Os embriões foram avaliados em dois momentos do desenvolvimento, 48 horas após a FIV para analisar a taxa de clivagem (embriões com duas ou mais células), e no sétimo dia (D7) após a FIV, para determinação da produção de blastocistos. A porcentagem de mórulas e blastocisto produzidos foram calculadas em relação ao total de ovócitos utilizados.

Neste experimento, a proporção média de produção final de mórulas foi de $2,34 \pm 2,45\%$ proporção média final de blastocistos dói de $0,90 \pm 1,81\%$, descritos no Gráfico 2.

FIGURA 11: Gráfico da proporção média final de produção *in vitro* de Mórulas e Blastocistos de ovelhas.



Apesar da proporção de embriões produzidos ter sido baixa no presente estudo, numericamente a produção de mórulas foi superior a de blastocistos produzidos. Este aumento de mórulas possivelmente ocorreu devido a menor qualidade dos embriões que são produzidos *in vitro*. Esses achados estão presentes também em estudos descritos

anteriormente em que, além qualidade inferior dos embriões produzidos *in vitro*, estes possuem menor metabolismo e menor expressão gênica (NIEMANN & WRENZYCKI, 2000). Além disso, muitos dos embriões produzidos nestes estudos pararam a clivagem provavelmente devido a ausência de fatores ainda desconhecidos no meio, bem como a presença de um ambiente inadequado de cultivo para a espécie ovina, fazendo com que não ocorresse a ativação do genoma embrionário, que resultou em baixo índice de clivagem (RIZOS *et al.*, 2002b).

Do mesmo modo, estudos descreveram anormalidades em embriões de PIV, apresentando citoplasma mais escuro, de baixa densidade, aumento intracelular de triglicérides, presenças de blastômeros edemaciados, maior fragilidade na zona pelúcida, diferenças na comunicação intercelular e maior incidência de anormalidade cromossômica (VAM SOOM *et al.*, 2002), que resultaram em menor produção de blastocistos, o que possivelmente ocorreu no presente estudo .

Apesar da técnica de PIV já ser consagrada para a espécie bovina, dos 80% de ovócitos bovinos que são maturados e fertilizados *in vitro* (FIV), e que conseguem completar o primeiro ciclo meiótico, culminando com a primeira clivagem para o estágio de duas células, apenas 40 à 50% conseguiram chegar até o estágio de blastocisto (HASLER, 2000). Segundo este autor, este fato ocorreu, pois, o período de cultivo (CIV), representa a fase mais longa de todo o processo de produção de embrião *in vitro*, demonstrando exercer grande influência na ativação do genoma embrionário, agindo diretamente na produção dos blastocistos.

Porém, dados de Rizos *et al.*, (2002a), divergem dessa linha, pois apontam que a qualidade dos ovócitos submetidos à maturação e posterior fertilização *in vitro*, foram os responsáveis por influenciaram diretamente a competência oocitária até atingirem o estágio de final de produção embrionária, que está de acordo com os achados do presente estudo. Nesse último, o material coletado, tanto os ovários quanto os ovócitos foram provenientes de abatedouro, não havendo seleção do animal com idade, escore corporal e eficiência reprodutiva, havendo grande variação em relação a qualidade oocitária utilizada.

Apesar da proporção da produção de mórulas ter sido numericamente superior em relação à de blastocistos produzidos, os índices de embriões foram baixos em relação à espécie bovina descrita por outros autores. Segundo alguns estudos (LONERGAN *et al.*, 1999), os embriões produzidos *in vitro*, possuem diminuição da velocidade de desenvolvimento, e a clivagem do zigoto está intimamente ligada à competência embrionária. Já o relato de Baldassare *et al* (2003), aponta que os ovócitos de ovelhas devem ser maturados e fertilizados *in vitro*, porém no dia 2 (D2) pós-fertilização, os zigotos devem ser transferidos

para o oviduto da ovelha para completar o cultivo e ocorrer a ativação do genoma embrionário por estarem num ambiente de cultivo mais adequado. Nas ovelhas a ativação genômica ocorre quando as células encontram-se no estágio de oito à 16 células, que coincide com o aumento da atividade metabólica, síntese de proteína, consumo de O₂ e aumento de carboidratos (THOMPSON *et al.*, 1996) até a clivagem para o estágio de blastocisto.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nas condições experimentais do presente estudo permitem concluir que:

- 1- A adição de 10% de SFB teve efeito deletério na MIV de ovinos, de tal forma que o tratamento de maturação *in vitro* suplementado com 10% SFB e 100µM do antioxidante cisteamina melhorou a maturação nuclear dos ovócitos de ovelhas coletados de abatedouro.
- 2- A produção de mórulas foi maior em relação à produção de blastocisto, porém os índices de produção de embriões ovinos *in vitro* foi pequeno.
- 3- Há a necessidade de novos estudos para padronização da biotecnologia PIV nas etapas da MIV, FIV e CIV nesta espécie, e comparação com os resultados do presente estudo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEYDEERA, L.R.; WANG, W.H.; CANTLEY, T.C.; PRATHER, R.S.; DAY, B.N. Presence of β -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.747-756, 1998.

ACCARDO, C., DATTENA, M., PILICHI, S., MARA, L., CHESSA, B., CAPPAL, P. Effect of recombinant human FSH and LH on *in vitro* maturation of sheep oocytes: embryo development and viability. **Anim. Reprod. Sci.**, v.81, p.77-86, 2004.

ALI, A., SIRARD, M. A. The effects of 17 beta-estradiol and protein supplement on the response to purified and recombinant follicle stimulating hormone in bovine oocytes. **Zigoto**, v.10, p.65-71, 2002.

ANDERIESZ, C.; FERRARETTI, A.P.; MAGLI, C.; FIORENTINI, A.; FORTINI, D.; GIANAROLI, L.; JONES, G.M.; TROUNSO, A.O. Effect of recombinant human gonadotrophins on human, bovine and murine oocyte meiosis, fertilization and embryonic development *in vitro*. **Hum. Reprod.**, v.15, p. 1140-1148, 2000.

AVELINO, K.B. Estimulação e inibição da síntese de glutathiona em oócitos bovinos: efeito sobre a maturação e desenvolvimento embrionário *in vitro*. **Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal**, 92 p, 2004.

BALDASSARE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; KEFFER, C.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C.N. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* embryo production technologies. **Theriogenology**, v.57, p.275-84, 2003.

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

-
- BERNARDI, M. L. Produção *in vitro* de embriões ovinos. **Acta Scientiae Veterinaria**, v.33, p.1-16, 2005.
- BING, Y.Z.; HIRAO, K. IGA; CHE, L.M.; TAKENOUCI N.; KUWAYAMA M.; FUCHIMOTO; RORIGUEZ-MARTINEZ H.; NAGAI T.. *In vitro* maturation and glutathione synthesis of porcine in the presence or absence of cysteamine under different oxygen tensions: role of cumulus cells. **Reprod. Fertil. Desev.**, Japan, v. 14, p. 125-131, 2002.
- BYRNE, G. P., LONERGAN, P., WADE, M., DUFFY, P., DONOVAN, A., HANRAHAN, J. P., BOLAND, M. P. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility *in vivo* and *in vitro*. **Anim. Reprod. Sci.**, v.62, p.265-275, 2000.
- 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. **Mol. Reprod. Dev.**, v.63, p. 451-458, 2002.
- CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; VAN LANGENDONCKT, A.; MERMILLOD, P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Theriogenology**, v.43, p.1115-1128, 1995.
- CHIAN, R. C., NIWA, K. AND SIRARD, M. A. Effect of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, v.41, p. 1499-1508, 1994.
- CHOI, Y. H., CARNEVALE, E. M., STEIDEL, G. E., SQUIRES, J., SQUIRES, E. L. Effects of gonadotrophins on bovine oocytes matured in TCM-199. **Theriogenology**, v.56, p.661-670, 2001.
- COGNIÉ Y.; POULIN, N.; LACATELLI Y.; MERMILLOD, P. State of the art production, conservation and transfer of *in vitro* produced embryos in small ruminant. **Reprod. Fert. Dev.**, v.16, p.437-445, 2004.
- COGNIÉ, Y. AND POULIN, N. Developmental competence of goat oocytes is increased after *in vitro* maturation with follicular fluid from goats stimulated by gonadotrophins. In: **Proceedings of the 14th International Congress on Animal Reproduction**, v.18, p. 39 (abstract), 2001.

COGNIÉ, Y., BARIL, G., POULIN, N., BECKERS, J. F. The ovulation rate obtained after a superovulatory treatment associating GnRH antagonist and pFSH is highly repeatable. **Proc. 16th Mtg. Assoc. Eur. Trans. Bem.**, v.130, 1999.

COGNIÉ, Y., BARIL, G., POULIN, N., MERMILLOD, P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. **Theriogenology**, v.59, p.171-188, 2003.

DATTENA, M.; PTAK, G.; LOI, P.; et al. Survival and viability of vitrified *in vitro* and *in vivo* produced ovine blastocysts. **Theriogenology**, v.53, p.1511-1519, 2000.

DAYAN, A.; WATANABE, M.R.; WATANABE, Y. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FIV. **Arq. Fac. Vet. UFRS**, v. 28, p.181-185, 2000.

DE MATOS, D. G., GASPARRINI, B., PASQUALINI, S. R., THOMPSON, J. G. Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. **Theriogenology**, v.57, p.1443-1451, 2002a.

DE MATOS, D. G.; FURNUS, C. C. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development effect of β -mercaptoetanol, cyteine and cystine. **Theriogenology**, v.53, n.3, p. 761-771, 2000.

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, n2, p.203-209, 2002b.

DOWNS, S.M.; MASTROPOLO, A.M. Culture conditions affect meiotic regulation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, v.46, p.551-566, 1997.

EVANS, G.; MAXWEEL, W.M.C. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths, Sydney, 1990.

FENWICK, J.; PLATTEAU, P.; MURDOCH, A.P.; HERBERT, M. Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos *in vitro*. **Hum. Reprod.**, v.17, p.407-412, 2002.

FEUGANG, J.M.; DE ROOVER, R.; MOENS; LEONARD, S.; DESSY, F.; DONNAY, I. Addition of β -mercaptoetanol 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.

FRY, R.C.; SIMPSON, T.L.; SQUIRES, T.J. Ultrasonically guided transvaginal oocyte recovery from calves treated with or without GnRH. **Theriogenology**, v. 49, p. 1077-1082, 1997.

FUKUI, Y.; GLEW, A.W.; GANDOLFI, F.; MOOR, R.M. Ram-specific effects on *in-vitro* fertilization and cleavage of sheep oocytes matured *in vitro*. **J. Reprod. Fert.**, v.82, p. 337-340, 1988.

GANDOLFI, T.A.; GANDOLFI, F. The material legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v.55, p. 1255-1276, 2001.

GARDNER, D. K.,LANE, M. SPITZER, M., BATT, 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. **Biol. Reprod.**, 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. 1537-1542, 2000.

GASPARRINI, B.; SAYOUD, H.; NEGLIA, G.; DE MATOS, D. G.; DONNAY, I.; ZICARELLI, L. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of buffalo oocytes: effects of cysteamine on embryo development. **Theriogenology**, v.60, p.943-952, 2003.

GESHI, M.; YONAI, M.; SAKAGUCHI, M.; NAGAI, T. Improvement of *in vitro* co-culture systems for bovine embryos using a low concentration of carbon dioxide and medium supplement with β -mercaptoetanol. **Theriogenology**, v,51, p.551-558, 2000.

GÓMEZ, M. C., CATT, J. W., EVANS, G., MAXWELL, W. M. C. Cleavage development and competence of sheep embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection and *in vitro* fertilization. **Theriogenology**, p.1143 , 1998.

-
- GORDON, I. **Laboratory Production of Cattles Embryos**. Biotechnology in Agriculture N.11. CAB International, Wallingford, UK, 1994, 640p.
- GUERIN, Y.; COGNIE, Y.; POULIN, N. Fertilisability of freshly ejaculated or frozen ram semen *in vitro*. **12th Int. Cong. Anim. Reprod. Art. Insem.**, The Hague, p.1418-1420, 1992.
- HENDRIKSEN, P.J.M. bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. **Theriogenology**, v.53, p.11-20, 2000.
- HOLM, P., IRVINE, B. J., ARMSTRONG, D. T., SEAMARK, R. F. Effect of oviduct epithelial cells on the fertilization and development of sheep oocytes in vitro. **Anim. Reprod. Sci.**, v.36, p.227-241, 1994.
- HUNEAU, D., CROZET, N., AHMED-ALI, M. Estrus sheep serum as a potent agent for ovine IVF: effect on cholesterol efflux from spermatozoa and the acrossome reaction. **Theriogenology**, v.42, p.1017-1028, 1994.
- HYTTEL, P. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23-32, 1997.
- KIM, S. K.; MINAMI, N.; YAMADA, M.; UTSUMI, K. The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes during in vitro maturation. **Zigote**, v.8, p.25-32, 2000.
- KNAPEN, M.F.C.M.; ZUSTERZEEL, P.L.M.; PETERS, W.H.M.; STEEGERS. A.P. Glutathione and glutathione related enzymes in reproduction: a review. **European Journal of Obstetrics Gynecology Reproductive Biology**, v.82, p.171-184, 1999.
- KRISHER, R.L.; BAVISTER, B.D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, v. 49, p. 103-114, 1998.
- LEDDA, S., BOGLIOLO, L., LEONI, G., NAITANA, S. Cell coupling and maturation-promoting factor activity in in vitro-matured prepubertal and adult sheep oocytes. **Biol. Reprod.**, v.65, p.247-252, 2001.
- LEDDA, S.; BOGLIOLO, L.; CALVIA, P.; LEONI G.; NAITANA, S. Meiotic progression and developmental competence of oocytes collected from juvenile and adult ewes. **J. Reprod. Fert.**, v.109, p.73-78, 1997.

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

LEONI, G. G., ROSATI, I., SUCCU, S., BOGLIOLO, L., BEBBERE, D., BERLINGUER, F., LEDDA, S., NAITAMA, S. A low oxygen atmosphere during IVF accelerates the kinetic of formation of in vitro produced ovine blastocysts. **Reprod. Dom. Anim.**, v.42, p.299-304, 2007.

LEONI, G. G., SUCCU, S., BERLINGUER, F., ROSATI, I., BEBBERE, D., BOGLIOLO, L., LEDDA, S., NAITANA, S. Delay on the in vitro kinetic development of prepubertal ovine embryos. **Anim. Reprod. Sci.**, v.92, p.373-383, 2006.

LI, J.; FOOTE, R.H. Culture of rabbit zygotes into blastocysts in protein-free medium with one to twenty per cent oxygen. **J. Reprod. Fert.**, v.98, p. 163-167, 1993.

LI, J.; GAO, X.; QIAN, M.; EATON, J.W. Mitochondrial metabolism underlies hyperoxic cell damage. **Free Radic. Biol. Med.**, v.36, 1460-1470, 2004.

LIM, J.M.; HANSEL, W. Exogenous substances affecting development of *in vitro* derived bovine embryo before and after embryonic genome activation. **Theriogenology**, v.46, p.429-439, 2000.

LONERGAN, P.; CAROLAN, C.; VAN LANGENDONEKT, A.; DONNAY, I.; KHATIR, H.; MERMILLOD, P. Role of epidermal growth factor in bovine oocytes maturation and preimplantation embryo development in vitro. **Biol. Reprod.**, v.54, p. 1420-1429, 1994.

LONERGAN, P.; KHATIR, H.; PIUMI, N.; RIEGER, D.; HUMBLLOT, P.; BOLAND, M.P. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the development characteristics, sex and pregnancy rates following transfer of bovine preimplantation embryos. **J. Reprod. Fertl.**, v.114, p. 1243-1258, 1999.

LONERGAN, P.; O'KEARNEY-FLYNN, M.; BOLAND, M.P. Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. **Theriogenology**, v.51, p. 1565-1576, 2000.

-
- MARTINS, A.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B.G. Use of recombinant gonadotrophins for bovine embryo production *in vitro*. **Theriogenology**, v.49, p. 292, 1998.
- MIKKELSEN, A.L.; SMITH, S.; LINDENBERG, S. Possible factors affecting the development of oocytes *in vitro* maturation. **Hum. Reprod.**, v.15 (Suppl. 5), p.11-17, 2000.
- MODINA, S. LUCIANO, A.M.; SCESI, L.; PERAZZOLI, F.; LAURIA, A.; GANDOLFI, F. Recombinant FSH stimulates developmental, competence of bovine oocytes and B-catenin can be used as early marker of normal embryonic development. **Proceedings of the 14th International Congress on Animal Reproduction**, p.2-6, 2000.
- MORRIS, L. H. A., RANDALL, A. E., KING, W. A., JOHNSON, W. H., BUCKRELL, B. C. The contribution of the male to ovine embryogenesis in *in vitro* embryo production system. **Anim. Reprod. Sci.**, v.75, p.9-26, 2003.
- MORTON, K. M., DE GRAAF, S. P., CAMPBELL, A., TOMKINS, L. M., CHIS MAXWELL, W. M., EVANS, G. Repeat ovum pick-up and *in vitro* embryo production from adult ewes with and without FSH treatment. **Reprod. Dom. Anim.**, v.40, p.422-428, 2005.
- MOSSA, F., LEONI, G. G., BERLINGUER, F., SUCCU, S., MADEDDU, M., BEBBERE, D., NAITANA, S. Recovery of COCs from ovaries with high follicle numbers enhances *in vitro* embryo yield in sheep. **Anim. Reprod. Sci.**, v.5, p.113, 2007
- MOTLIK, J. Interplay between cdc2 quinase and MAP quinase pathway during maturation of mammalian oocytes. **Theriogenology**, v.49, p.461-469, 1998.
- MURDOCH, W. J. Inhibition by estradiol of oxidative stress induced apoptosis in pig ovarian tissues. **J. Reprod. Fertil.**, v.114, p.127-130, 1998.
- NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture condition: implication for subsequent development. **Theriogenology**, v. 53, p.21-34, 2000.
- O'BRIEN, J.K.; BECK, N.F.G.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS G. Effect of hormone pre-treatment of prepuberal sheep on the production and development capacity of oocytes *in vitro* and *in vivo*. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.9, p.625-631, 1997.

O'MEARA, C.M.; HANRAHAN, J.P.; DONOVAN, A.; FAIR, S.; RIZOS, D.; WADE, M.; BOLAND, M.P.; EVANS, A.C; LONERGAN, P. Relationship between *in vitro* fertilization of ewe oocytes and the fertility of ewes following cervical artificial insemination with frozen-thawed ram semen. **Theriogenology**, v. 64, p. 1797-1808, 2005.

O'NEILL, D.J. Studies on the cryopreservation of ram spermatozoa. MSc (Agr.) **Thesis, National University of Ireland**, 1998.

PTAK, G., DATTENA, M., LOI, P., TISCHNER, M., CAPPAL, P. Ovum pick-up in sheep: efficiency of *in vitro* embryo production, vitrification and birth offspring. **Theriogenology**, v.52, p.1105-1114, 1999.

QUINN, P.; HARLOW, G.M. The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos *in vitro*. **Journal Experimental Zoology**, v. 206, p. 73-80, 1978.

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

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*. **Mol. Reprod. Dev.**, v.62, p.320-327, 2002.

RIZOS, D., LONERGAN, P., BOLAND, M. P., ARROYO-GARCIA, R., PINTADO, B., DE LA FUENTE, J., GUTIERREZ-ADAN, A. Analysis of differential mRNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. **Biol. Reprod.**, v.66, p.589-595, 2002a.

RIZOS, D., LONERGAN, P., WARD, F., DUFFY, P., BOLAND, M.P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Mol. Reprod. Dev.**, v.61, p. 234-248, 2002b.

RODRIGUÉZ-GONZÁLEZ, E.; LÓPESBEJAR, M.; MERTENS, M.J.; PARAMIO, M.T. Effects on *in vitro* embryo development and intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation of prepuberal goat oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.65, p. 446-453, 2003.

-
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H; LARSSON, B.; PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. **Reprod. Fertil.**, v. 9, p. 297-308, 1997
- SALAMONE, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen: I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Anim. Reprod. Sci.**, v.37, p.185-249, 2001.
- SINCLAIR, K.D.; MAXFIELD, E.K.; ROBINSON, J.J.; MALTIN, C.A.; MCEVOY, T.G.; DUNNE, L.D.; *et al.* Culture of sheep zygotes can alter fetal growth and development. **Theriogenology**, v.50, p.380, 1998.
- SMITH, J.F.; BRIGGS, R.M.; MURRAY, G.R.; PARR, J.; DUGANZICH, D.M. Sources of variation in the *in vitro* assessment of frozen ram sperm viability. **Proceedings of the 13th ICAR Conference on Techniques for Gamete Manipulation and Storage**, Hamilton, New Zealand, 22-24 June, 1996.
- SMITH, J.F.; MURRAY, G.R.; PARR, J.; DUGANZICH, D.M. Heterologous IVF assay as a fertility predictor for frozen ram semen. **Proceedings of the 28th Annual Conference on Australian Society for Reproductive Biology**, Vertebrate Biocontrol Co-operative Research Centre, Australia, p.90, 1997.
- SMITH, J.F.; TERVIT, H.R.; MCGOWAN, L.T.; PUGH, P.A. Effect of aspiration system on the recovery and development of sheep follicular oocytes. **Proc. Austr. Soc. Reprod. Bio.**, Brisbane, Australia, v.26, p16, 1994.
- STAIGMILLER, R. B. AND MOOR, R. M. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. **Gamete Res.**, v.9, p. 221-229, 1984.
- TATEMOTO, H., SAKURAI, N., MUTO, N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of cumulus cells. **Biol. Reprod.**, v.63, p.805-810, 2000.
- THOMPSON, J. G. E., SIMPSON, A. C., PUGH, P.A., DONNELLY, P. E., AND TERVIT, H. R. Effect of oxygen concentration on *in vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. **J. Reprod Fertil.**, v. 89, p. 573-538, 1990.

THOMPSON, J. G. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. **Anim. Reprod. Sci.**, v.30, p.273-280, 2000.

THOMPSON, J.G. Comparison between *in vivo* derived and *in vitro* produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.9, p.341-354, 1996.

THOMPSON, J.G.; GARDNER, D.K.; PUGH, P.A.; MCMILLAN, W.H.; TERVIT, H.R. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during *in vitro* pre-elongation development of ovine embryos. **Biol. Reprod.**, v.53, p. 1385-1391, 1995.

TRIBAUT C. Are follicular maturation and oocyte maturation independent process? **Journal Reproduction and Fertility**, v.51, p. 115, 1977.

VALCARCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A.; MOSES, D.F.; PEREZ, L.J.; BALDASSARE, H. Comparison between Sephadex G-10 and Percoll for preparation of normospermic, asthenospermic and frozen-thawed ram semem, asthenospermic an frozen-thawed ram semen. **Anim. Reprod. Sci**, v. 41, p. 215-224, 1996.

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

WALKER, S.K.; HILL, J.L.; KLEEMAN, D.O.; NANCARROW, C.D. Development of ovine embryos in synthetic oviductal fluid containing amino acids at oviductal fluid concentration. **Biol. Reprod.**, v.55, p.703-708, 1996.

WANG, S.; COCKETT, N.E.; MILLER, J.M.; SHAY, T.L.; MACIULIS, A.; SUTTON, D.L.; *et al.* Polymorphic distribution of the ovine prion protein (PrP) gene in scrapie-infected sheep flocks in which embryo transfer was used to circumvent the transmissions of scrapie. **Theriogenology**, v. 57, p. 1865-1875, 2002.

WARD, F.; ENRIGHT, B; RIZOS, D; BOLAND, M; LONERGAN, P. Optimization of *in vitro* bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. **Theriogenology**, v.57, p. 2105-2117.

WATSON, A.J.; DE SOUSA, P.; CAVENEY, 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.; WATSON, P.H.; WARNES, D.; WALKER, S.K.; ARMSTRONG, D.T.; SEAMARK, R.F. Preimplantation development of *in vitro* fertilized ovine zygote: comparison between coculture on oviduct epithelial cell monolayers and culture under low oxygen atmosphere. **Biol. Reprod.**, v.50, p.715-724, 1994.

WINDSOR, D.P. Mitochondrial function and ram sperm fertility. **Reprod. Fert. Dev.**, v. 55, p. 279-284, 1997.

WRAMSBY, H.; LIEDHOLM, P. Importance of the use of short and long sperm pre-incubation periods in assessing the fertilizing capacity of human spermatozoa by hamster test. **Hum. Reprod.**, v.1, 171-173, 1986.

WRIGHT, R. W. JR. Successful culture *in vitro* of swine embryos to blastocyst stage. **J.Anim. Sci.**, v.44, p. 854-858, 1977.

YAMAUCHI, N., AND NAGAI, T. Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after *in vitro* maturation in the presence of cysteamine. **Biol. Reprod.**, v.61, p. 828-833, 1999.

YANG, B. K., YANG, X., AND FOOT, R. H. Early development of IMV/IVF bovine embryos culture with or without somatic cells in a simple serum-free medium with different concentrations of CO₂ and O₂. **J. Reprod. Dev.**, v.40, p. 1-9, 1994.

YUE, Z.; MENG, F.J.; JØRGENSEN, N; ZIEBE, S.; NYBOERSON, A. Sperm morphology using strict criteria after Percoll density separation: influence on cleavage and pregnancy rates after *in vitro* fertilization. **Hum. Reprod.**, v. 10, p. 1781-1785, 1995.