

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**ESTRATÉGIAS PARA INDUÇÃO DE COMPETÊNCIA DE OÓCITOS  
BOVINOS COM ATIVIDADE DA ENZIMA GLICOSE 6-FOSFATO  
DESIDROGENASE**

MAURÍCIO BARBOSA SALVIANO

PORTO ALEGRE, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ESTRATÉGIAS PARA INDUÇÃO DE COMPETÊNCIA DE OÓCITOS BOVINOS  
COM ATIVIDADE DA ENZIMA GLICOSE 6-FOSFATO DESIDROGENASE

**Autor: Maurício Barbosa Salviano**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias na Área de Reprodução Animal – Biotécnicas de Reprodução.

**Orientador: Prof. Dr. José Luiz Rodrigues**

PORTO ALEGRE, 2014

## CIP - Catalogação na Publicação

Salviano, Maurício Barbosa

Estratégias para indução de competência de oócitos bovinos com atividade da enzima Glicose 6-Fosfato Desidrogenase / Maurício Barbosa Salviano. -- 2014. 64 f.

Orientador: José Luiz Rigo Rodrigues.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Teste BCB. 2. Complexos Cumulus-oócito. 3. Maturação in vitro. 4. Efeito parácrino. I. Rodrigues, José Luiz Rigo, orient. II. Título.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho as pessoas mais importantes da minha vida, meu pai Adeodato, minha mãe Margareth, minhas irmãs Ivana e Christine e aos meus sobrinhos, Wolner Neto e Ivna.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a **Deus** e todos os **amigos espirituais** por me oportunizarem todos os momentos vividos até aqui. Ao meu estimado orientador **Prof. Dr. José Luiz Rodrigues**, pela confiança e ensinamentos que envolveram todas as etapas deste doutoramento, desde ensinamentos acadêmicos até sobre enologia.

Gostaria de agradecer aos **Faculdade de Veterinária** e o **Programa de Ciências Veterinárias** da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em nome dos funcionários pela presteza nos atendimentos.

Aos colegas de laboratório: **Favorino Collares, Bruno Becker, Sr. João Roberto** e **Fernanda Varela** pelo apoio durante a realização deste trabalho além das conversas animadas e churrasquinhos.

Aos amigos extra universidade: **Hemerson Pablo, Luiz Vinicius** e **Felipe** pelos momentos de descontração seja nos churrascos, pescarias, baladas, etc. Não poderia deixar de lembrar a **Pousada Agronomia**, onde toda a vida no Rio Grande do Sul começou.

Gostaria muito de agradecer à banca da minha qualificação e defesa do doutorado **Prof. Dr. Fernando Bortolozzo, Dra. Ligia Pegoraro, Dr. Ricardo Azambuja, Prof. Dr. Marcelo Bertolini** e **Prof. Dr. João Batista Borges Souza** pelas críticas acerca de nosso trabalho.

Gostaria de agradecer aos **Prof. Dr. Marcelo Bertolini** e **Profa. Dra. Luciana Relly Bertolini** pelos ensinamentos e oportunidade de acompanhar as atividades no Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento da Universidade de Fortaleza, e na oportunidade agradecer a todo o pessoal do laboratório, em especial ao **Cristiano Feltrin, Leonardo Tondello, Saul Gaudêncio, Débora, Igor, Carol** e **Juliana**.

À empresa **Biotecnologia Animal**, de Brasília e todos os seus técnicos, funcionários e em especial ao **Dr. Maurício, Dr. Luis Mauro, Dra. Patrícia** e **Dr. Luis Gustavo**.

À minha namorada **Vitória Dalmagro** e família (**Sr. Carlinhos, D. Cadi** e **Felipe**) pelo apoio e alegria nos momentos de tristeza e de necessidade de um ombro amigo na ausência dos familiares devido à distância.

Aos meus amados familiares paternos: **vovós Luís** (*in memoriam*) e **Cotinha Salviano**; tios **Maurício, Jovenilia, Jandira, Leal, Jacira, Núbia**, aos primos **Viviane,**

**Vitória, Victor, Rômulo, Daniele, Bruno, Maria Luiza, Maria Clara, Matheus, Luciana, Frederico, Fernandinha, Miguel, Ulisses, Érica, Luiz Vinícius, Erika, Débora, Samuel, Marcos, Andrea, Gusthavo e Leonardo.**

Aos meus amados familiares maternos: **vovós Xavier** (*in memoriam*) e **Ivan**, aos tios **Carlos Henrique, Joseana e Xavier Filho** e aos primos **Beatriz, Carlos Henrique Filho, Luis Neto e Gabriela.**

E para terminar, a parte mais importante para mim: Meus pais **Adeodato e Margareth Salviano**, minhas irmãs **Christine e Ivana**, aos cunhados **Tadeu e Wolner Filho** e aos meus amados sobrinhos **Wolner Neto e Ivna.**

Como um breve comentário e já servindo-me de um agradecimento especial: ao meu pai, agrônomo e professor universitário ao qual me inspiro para seguir suas trilhas e ser tão bom quanto ele. À minha mãe, veterinária atenciosa para com o animais, inteligente e segura para com todos os seus afazeres. Ao meu tio Maurício, veterinário e professor universitário com o qual converso sobre vários assuntos em especial sobre nossa profissão e pesquisas com ruminantes!

Meus sinceros agradecimentos a todos...

## **EPÍGRAFE**

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas eu não teria saído do lugar. As facilidades os impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”*

*Chico Xavier*

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi modificar os procedimentos da maturação *in vitro* (MIV) para induzir a competência de oócitos bovinos com intensa atividade da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), determinada pelo emprego do corante vital Azul de Cresil Brilhante (BCB). Foram realizados dois experimentos; no primeiro trabalho foi realizada a MIV de oócitos após a identificação da atividade da G6PDH, empregando-se a seguinte proporção: competentes (sem atividade enzimática)/não competentes - 10:01, respectivamente. Os resultados revelaram um efeito negativo dos oócitos não competentes sobre a capacidade dos competentes em realizarem a MIV, a FIV e a CIV. Os resultados sugerem que para aumentar a produção de embriões deve-se realizar a MIV de oócitos competentes e não competentes, separadamente. O objetivo do segundo experimento foi verificar se a prolongação do tempo de MIV (30h) afetaria as taxas de MIV, FIV e CIV obtidas a partir de oócitos não competentes. Os oócitos não competentes não foram afetados, positiva ou negativamente, pelo prolongamento do tempo de MIV, no entanto, os oócitos competentes sofreram decréscimo na capacidade de serem fecundados e desenvolverem-se até o estágio de blastocistos. Podemos concluir que as modificações realizadas no procedimento da MIV não foram capazes de induzir competência em oócitos com intensa atividade da enzima G6PDH.

Palavras-Chave: Teste BCB, Complexos *cumulus*-oócito, maturação *in vitro*, efeito parácrino

## ABSTRACT

The present work aimed modify the *in vitro* maturation (IVM) procedure to induce competence of bovine oocytes with high glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity. Two experiments were carried out; the first non-competent oocytes (with high enzymatic activity) were matured with competent oocyte (lower G6PDH activity) on proportion of 1:10, respectively. The second experiment aimed observe the effect of prolonged IVM (from 24 to 30h) on the cleavage and development rates in oocytes with higher enzymatic activity. Our data showed that oocytes with lower enzymatic activity did not induce competence of higher G6PDH activity oocyte. However, we observed a negatively effect on the cleavage and development rates on oocytes competent, then, to increase the number of embryos *in vitro* produced we need to mature oocytes competent and non-competent separately. In the second experiment, the non-competent gametes submitted to prolonged IVM were not affected, however, competent oocytes were negatively affect by prolonged IVM. We can concluded that the IVM modifications did not able to induce the competence in the oocytes with high G6PDH activity.

Keywords: BCB test, complex *cumulus*-oocyte, *in vitro* maturation, paracrine effect.

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO 1

Figure 1 – Scheme of IVM where BCB+ were maintained separate from BCB- oocytes using the same medium drop. To confection a closed glass microcapillary, the extremities were closed by fire, after that the microcapillary was sterilized by fire and then it was gently placed into the medium drop (80  $\mu$ L) under mineral oil. This procedure allow to divide the drop environment into two compartments (I), having a communication between them on top of drop (II). ..... 31

### ARTIGO 2

Figura 1 – Porcentagem de blastocistos ao sétimo e oitavo dia produzidos a partir de oócitos bovinos classificados pelo teste BCB e maturados *in vitro* por 24 ou 30 horas.. ..... 45

## **LISTA DE TABELAS**

### **ARTIGO 1**

Table 1 – Influence of BCB test on further development of bovine oocytes..... 32

Table 2 – Cleavage and embryo development of BCB+ in presence of BCB- bovine oocytes. .... 32

### **ARTIGO 2**

Tabela 1 – Taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário inicial de oócitos bovinos classificados de acordo com o teste de BCB e submetidos à MIV por 24 e 30 horas .... 44

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Porcentagem
µL	Microlítros
µm	Micrômetros
µM	Micromolar
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ATP	Adenosina trifosfato
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCB	Azul Cresil Brilhante ( <i>Brilliant Cresyl Blue</i> )
BCB <sup>+24h</sup>	Grupo de oócitos BCB+ maturados <i>in vitro</i> por 24h
BCB <sup>+30h</sup>	Grupo de oócitos BCB+ maturados <i>in vitro</i> por 30h
BCB <sup>-24h</sup>	Grupo de oócitos BCB- maturados <i>in vitro</i> por 24h
BCB <sup>-30h</sup>	Grupo de oócitos BCB- maturados <i>in vitro</i> por 30h
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BMP	Proteína morfogenética óssea ( <i>Bone morphogenetic protein</i> )
BSA	Albumina sérica bovina ( <i>Bovine serum albumin</i> )
CCO	Complexo <i>Cumulus</i> -oócito
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COC	<i>Cumulus-oocyte complex</i>
COCs	<i>Cumuli-oocytes complexes</i>
D	Dia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	Fator de crescimento epidermal ( <i>Epidermal growth factor</i> )
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante ( <i>Follicle Stimulating Hormone</i> )
g	Força centrífuga relativa
G	Gauges
G6PDH	Glicose 6-Fosfato Desidrogenase ( <i>Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase</i> )
GV	Vesícula germinativa
GVBD	Quebra da vesícula germinativa
h	Horas
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDL	Lipoproteína de alta densidade ( <i>High-density lipoprotein</i> )

HHE	Heparina-Hipotaurina-Epinefrina ( <i>Heparin-Hypotaurine-Epinefrine</i> )
IETS	Sociedade Internacional de Transferência de Embriões
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1 ( <i>Insulin-like growth factor 1</i> )
ITS	Insulina-Transferrina-Selênio
IVC	<i>In vitro culture</i>
IVF	<i>In vitro fertilization</i>
IVM	<i>In vitro maturation</i>
IVP	<i>In vitro production</i>
LH	Hormônio Luteinizante
LOS	Síndrome do bezerro grande ( <i>Large Offspring Syndrome</i> )
mg	Miligramas
MII	Metáfase II
min	Minutos
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mm <sup>2</sup>	Milímetros quadrados
MPF	Fator promotor de maturação
N	Número amostral ( <i>Sample number</i> )
N <sub>2</sub>	Nitrogênio
nM	Nanomolar
O <sub>2</sub>	Oxigênio
°C	Graus Celsius
PBS	Solução tampão fosfato-salina
PBSm	Tampão fosfato-salina modificado
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandina F <sub>2α</sub>
pH	Potencial hidrogeniônico
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PKA	Proteína quinase
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
s	Segundos
SFB	Soro fetal bovino
SOF	Fluido sintético de oviduto
SSM	Sperm selection médium
T3	Hormônio tri-iodotironina

TCM-199 Meio de cultivo tecidual 199  
TE Transferência de embriões  
USA Estados Unidos da América (*United State of America*)  
 $\chi^2$  Qui-quadrado

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
2.1. Produção in vitro de embriões .....	15
2.2. Competência do oócito e o desenvolvimento embrionário .....	19
2.3. Teste de Azul de Cresil Brilhante (Brilliant Cresyl Blue – BCB).....	22
3. ARTIGO 1 .....	26
Summary .....	26
Introduction .....	27
Material and Methods.....	28
Results .....	31
Discussion .....	33
References .....	36
4. ARTIGO 2 .....	39
Resumo.....	39
Introdução.....	40
Material e métodos .....	41
Resultados .....	43
Discussão.....	45
Referências Bibliográficas.....	48
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	51
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53
7. ANEXOS .....	60
7.1. Fotomicrografias de complexos Cumuli-oócitos após o teste BCB.....	60
7.2. Carta de seleção para participação do CBAB/CABBIO oferecido pelo Ministério de Ciência e Tecnologia em 2012.....	61
7.3. Artigo publicado no periódico Theriogenology em 2013 .....	62
7.4. Artigo publicado no periódico BMC Evolutionary Biology em 2014 .....	63
7.5. Resumo apresentado no Simpósio da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) 2013.....	64

## 1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões é uma biotécnica da reprodução animal que tem como objetivo o aproveitamento de gametas femininos com a possibilidade de serem fecundados por espermatozóides de doadores específicos.

As últimas estatísticas publicadas pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (*International Embryo Transfer Society – IETS*), referentes ao ano de 2012, mostram que mais de 440.000 embriões bovinos produzidos *in vitro* foram transferidos no mundo, sendo que o Brasil responde por aproximadamente 68% deste total (PERRY, 2013). A chave do sucesso da PIV no Brasil tem sido relacionada às raças zebuínas (VIANA *et al.*, 2010), em especial à Nelore (PONTES *et al.*, 2011).

Apesar do crescente interesse nesta biotecnologia (VIANA *et al.*, 2010), ela deve ainda ser aprimorada, posto que, apenas 30 a 40% dos oócitos utilizados chegarão ao estágio de blastocisto (LONERGAN & FAIR, 2014).

Um dos motivos que levam as perdas na eficiência da PIV é a falta de competência dos oócitos em responder ao processo de maturação *in vitro* (MIV) (COSTA *et al.*, 2013). Na prática, o critério morfológico de seleção ainda é o mais usado, ou seja, a partir da homogeneidade do citoplasma e/ou densidade e compactação das células do *Cumulus oophorus* (BUKOWSKA *et al.*, 2011). No entanto, este é um procedimento subjetivo e que não permite inferir sobre a competência do oócito em realizar a MIV.

Diferentes técnicas para selecionar oócitos com maior acurácia já foram idealizados e testados, incluindo biologia molecular através de marcadores, corantes fluorescentes, e até mesmo o emprego das *OMICs* como, por exemplo, metabolômica e proteômica (revisado por BUKOWSKA *et al.*, 2011). Porém, apesar da exatidão, estas técnicas são caras, invasivas ou até mesmo letais ao gameta.

Por outro lado uma promissora técnica vem tendo seu procedimento aperfeiçoado, com o emprego do corante vital Azul de Cresil Brilhante (BCB, do inglês *Brilliant Cresyl Blue*). Testada em oócitos pela primeira vez por ERICSSON *et al.* em 1993 é de execução simples, rápida, não invasiva e tem auxiliado, adicionalmente ao critério morfológico (OPIELA & KATSKA-KSAZKIEWICS, 2013).

O BCB penetra a célula e cora o citoplasma de azul, no entanto, quando estes oócitos ainda estão em fase de crescimento, onde há intensa atividade da enzima Glicose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH, do inglês *Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase* o corante é degradado e o citoplasma readquire a sua coloração habitual (BCB-). Nos oócitos que completaram a fase de crescimento, ou seja, estão prontos para serem submetidos à maturação nuclear e citoplasmática, esta enzima é fisiologicamente inativada e o citoplasma permanece corado de azul (BCB+).

O teste de BCB já foi utilizado com sucesso para seleção de oócitos competentes à MIV em várias espécies domésticas como suínos (ERICSSON *et al.*, 1993; ISHIZAKI *et al.*, 2009), caprinos (RODRÍGUEZ-GONZÁLES *et al.*, 2003), bovinos (PUJOL *et al.*, 2004; ALM *et al.*, 2005), caninos (RODRIGUES *et al.*, 2009), ratos (ALCOBA *et al.*, 2011), ovinos (WANG *et al.*, 2012), dentre outros.

Em um experimento conduzido em nosso laboratório e utilizando oócitos bovinos, Silva *et al.* (2011) demonstraram que o BCB foi eficiente para selecionar oócitos competentes (BCB+), e que estes, ao contrário dos não competentes (BCB-), realizavam simultaneamente as maturações do núcleo e do citoplasma. Com isso, nosso objetivo foi modificar os procedimentos da maturação *in vitro* (MIV) para induzir a competência de oócitos bovinos com alta atividade da enzima G6PDH.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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

A produção *in vitro* de embriões (PIV) tem se tornado uma das biotecnologias da reprodução animal de maior importância comercial na difusão de diferentes genomas, pois, além de ser uma ferramenta para aceleração genética de um rebanho, é base para várias outras biotecnologias como, por exemplo, a transferência nuclear e transgenia.

Historicamente, esta biotécnica surgiu no início da década de 80, do século passado com o nascimento do primeiro bezerro nascido a partir de um oócito fecundado e cultivado *in vitro* e, posteriormente, transferido para o oviduto de uma receptora (BRACKETT *et al.*, 1982).

Desde então, os processos envolvidos na PIV vinham sendo esclarecidos e conseqüentemente detalhados, até que em 1990, Fukuda *et al.* reportaram o nascimento do primeiro bezerro, onde os processos de maturação, fecundação e cultivo foram realizados totalmente *in vitro*.

Apesar de todo o avanço alcançado nas últimas três décadas, a eficiência da PIV ainda está longe de ser considerada ideal. Em bovinos, 90% dos oócitos submetidos à MIV atingem a fase de metáfase II (MII), aproximadamente 80% são fecundados e apenas 30 a 40% suportam o desenvolvimento até a fase de blastocisto (LONERGAN & FAIR, 2014).

Na literatura, existem relatos de vários pontos considerados chaves para o sucesso da PIV. Camargo *et al.* (2006) cita que o fator materno (conteúdo citoplasmático do oócito, por exemplo, proteínas e RNAm) é fundamental para que os gametas suportem a fecundação e desenvolvimento embrionário. O ambiente folicular, ao qual os oócitos foram mantidos antes da recuperação (LOONERGAN *et al.*, 1994; ARLOTTO *et al.*, 1996), ou mesmo a condição ambiental, em que as doadoras foram mantidas (WOLFENSON *et al.*, 2000).

O diâmetro do oócito parece ser um dos mais importantes fatores citados na literatura, pois, está relacionada com o acúmulo de RNAm e proteínas (FAIR *et al.*, 1995; MEIRELLES *et al.*, 2013). Lechniak *et al.* (2002) observaram que oócitos com pequeno diâmetro têm maior probabilidade de apresentar anomalias cromossômicas.

Os procedimentos laboratoriais inerentes à PIV são, possivelmente, os fatores mais estudados pelos cientistas, isso, devido à dificuldade em se determinar as necessidades biológicas dos gametas e embriões e reproduzi-las *in vitro* (SUMMERS & BIGGERS, 2003).

Em geral, os meios de cultivo embrionário são confeccionados baseando-se em dois princípios: “à escolha do próprio embrião” (“*Let the embryo choose principle*”) e outro na tentativa de mimetizar o ambiente ao qual as estruturas se encontrariam no organismo (“*Back-to-nature principle*”). Por exemplo, cultivo de oócitos em meios com hormônios semelhantes ao ambiente folicular, meios de fecundação mimetizando o ambiente interno à ampola do oviduto e meios de cultivo mimetizando as secreções encontradas no oviduto (SUMMERS & BIGGERS, 2003).

Em bovinos, a maturação oocitária é um complexo de eventos nucleares, citoplasmáticos e moleculares, que ocorrem de maneira sincrônica antes da ovulação (FERREIRA *et al.*, 2009). O processo de maturação do oócito ocorre no interior do folículo ovulatório, sob estímulo do hormônio luteinizante (LH) e os principais eventos nesta etapa são a redução da quantidade dos cromossomos à metade, produzindo uma célula haploide, estruturação das organelas citoplasmáticas para concretização da fecundação e estocagem de RNAm para reprogramação celular do espermatozóide e desenvolvimento embrionário inicial (HYTTEL *et al.*, 1997).

A reprodução deste fenômeno *in vitro* tem sido realizada com sucesso em laboratórios de PIV, pois, dos oócitos submetidos à maturação *in vitro* (MIV), 90% atingem a fase correspondente à ovulação em bovinos (MII) (LOONERGAN & FAIR, 2014). Essa taxa de MIV se tornou eficiente, utilizando meios complexos (com uso de aminoácidos, vitaminas dentre outros componentes) e indefinidos (presença de soro - abordado posteriormente). Porém, na presença de hormônio folículo estimulante (FSH – *Follicle Stimulating Hormone*) e LH (FAIR, 2013).

A maturação nuclear consiste na progressão da fase quiescente do núcleo (vesícula germinativa - GV) no oócito imaturo até o estágio de metáfase II (MII). Na condição *in vitro*, Sirard *et al.* (1989) observaram que até as 6h de MIV os oócitos apresentam-se em GV; entre 6 e 8h realizam a ruptura ou quebra da vesícula germinativa; entre 10 e 15h atingem o estágio de metáfase I; entre 15 e 16h anáfase I; entre 16 e 18h chegam à telófase I; e por fim, a partir de 18 até as 24h progridem até o estágio final da MIV (MII).

A maturação citoplasmática é um processo complexo e ainda não completamente esclarecido que envolve a multiplicação e reorganização das organelas citoplasmáticas (MAO, 2014).

Durante a fase de vesícula germinativa, as mitocôndrias estão distribuídas na periferia da célula, enquanto que, na metáfase II, dois padrões de distribuição são observados: quando maturado em meios contendo glicose e aminoácidos, as mitocôndrias se apresentavam no centro (gametas nesta condição foram competentes para formar blastocistos após fecundados); o outro padrão foi a manutenção destas organelas na periferia (relacionados à baixas taxas de desenvolvimento embrionário) (BAVISTER & SQUIRRELL, 2000).

Durante a fase de crescimento dos oócitos, os complexos de Golgi sofrem hipertrofia e proliferação, formando os grânulos corticais (LIU, 2011). Na condição de oócitos imaturos, os grânulos corticais estão dispersos aleatoriamente no citoplasma, porém, durante a MIV, há a migração destes para a periferia, onde ficarão distribuídos até o momento da fecundação (MAO, 2014). Essas organelas têm a função de impedir a polispermia através da exocitose (cálcio-dependente) no momento que o primeiro espermatozóide se ligar ao oócito (LIU, 2011).

Relacionados à etapa de fecundação *in vitro*, um dos trabalhos mais importantes foi realizado por Parrish *et al.* (1986), onde estes autores aumentaram as taxas de oócitos fecundados utilizando sêmen descongelado e para seleção de espermatozóides foi utilizado *swim up*, seguida da incubação na presença de heparina para capacitação. Hoje, essa metodologia é amplamente utilizada em laboratórios PIV com intuito comercial ou acadêmico devido a facilidade e homogeneidade das replicações (PARRISH *et al.*, 2014).

A capacitação *in vitro* de espermatozóides tem sido aprimorada para mimetizar os efeitos das secreções do oviduto sobre a célula espermática, embora neste procedimento sejam utilizados fatores capacitantes que atuam de forma sinérgica, por exemplo, adição de bicarbonato, BSA livre de ácidos graxos e o próprio método de seleção das células (GADELLA & LUNA, 2014).

O bicarbonato, no interior da célula espermática, ativa a adenilciclase para produção de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), consequentemente ativa a cascata da proteína quinase (PKA) dependente de AMPC, aumentando a fosforilação e, consequentemente, hiperativando o batimento do flagelo (VISCONTI *et al.*, 2002). O efeito da adição de albumina livre de ácidos graxos nos meios de capacitação e FIV é

mediado pela presença do bicarbonato e está relacionado à liberação do colesterol na superfície espermática, desestabilizando a membrana e consequentemente facilitando a reação acrossômica (GADELLA & LUNA, 2014).

O cultivo *in vitro* dos embriões pode ser realizado expondo-os a diferentes meios, como por exemplo, o SOF, CR1a, CZB, kSOM (CHATOT *et al.*, 1989; DONNAY *et al.*, 1996; LIU & FOOTE, 1995; TAKAHASHI & FIRST, 1992). Em virtude da variável sobrevivência *in vitro* nos diversos meios de cultivo, é possível observar que os embriões mamíferos possuem grande plasticidade (LANE, 2001).

Os meios de cultivo são classificados didaticamente em três tipos, levando-se em consideração sua composição: indefinidos (devido a presença de soro e/ou co-cultivo celular), semi-definidos (não há co-cultivo e o soro é substituído por albumina) e definidos (meios livre de proteínas, onde a albumina é substituída por macromoléculas como álcool polivinílico ou polivinil pirrolidona) (CAMARGO *et al.*, 2006).

Nos meios de cultivo indefinidos, o soro possui uma atividade multifatorial sobre os embriões, pois, além de conter substâncias benéficas, como: fatores de crescimento, aminoácidos, vitaminas e substratos energéticos; podem conter também vários fatores embriotóxicos (VANROOSE *et al.*, 2001; SUMMERS & BIGGERS, 2003; CAMARGO *et al.*, 2006; VARAGO *et al.*, 2008), além de outros componentes de atividade biológica ainda desconhecida.

O uso do soro (seja ele, soro fetal bovino, de vacas em anestro ou em cio) em várias etapas da PIV, mais especificamente na MIV e CIV, promove maiores frequências de maturação nuclear, clivagem e blastocistos (VANROOSE *et al.*, 2001; SUNTTON *et al.*, 2003). Porém, em contrapartida, apresentam um atraso das primeiras clivagens (até quatro células) e um aumento significativo no conteúdo lipídico intracelular, quando comparados com embriões *in vivo* (CAGNONE & SIRARD, 2014).

Outro viés, referente à PIV, é a hipótese de que a manipulação e/ou cultivo *in vitro* de gametas e embriões mamíferos cause vários distúrbios pré e pós-natais (HAJJ & HAAF, 2013). Em ruminantes, tem-se observado um aumento de peso ao nascimento, distúrbio primeiramente descrito em bovinos e conhecido como Síndrome do Bezerra Grande (LOS, do inglês, *Large Offspring Syndrome*) (YOUNG *et al.*, 1998).

Têm-se especulado que a retirada de gametas e embriões de seus ambientes naturais (gônadas, salpínges e útero) altera a expressão gênica, normalmente encontrada nestas estruturas *in vivo*, estando estas alterações relacionadas à adaptabilidade das

células às condições extra fisiológicas dos meios de cultivo (SUMMERS & BIGGERS, 2003).

Modificações epigenéticas referem-se à associação de alterações específicas do DNA e de seu empacotamento (cromatina), sendo que, estas não alteram a sequência do DNA e sim, a expressão dos genes associados (LUCAS, 2013). De acordo com este autor, a estrutura feto-embrionária mais acometida por alterações epigenéticas, durante a PIV, é o trofoectoderma e posteriormente seu órgão derivado, a placenta.

## 2.2. *Competência do oócito e o desenvolvimento embrionário*

A competência do oócito em progredir corretamente através da maturação, promover a fecundação e o posterior desenvolvimento embrionário ao estágio de blastocisto é um processo multifacetado que envolve diferentes alterações morfofuncionais do gameta (SIRARD *et al.*, 2006). Entre estas alterações pode-se destacar a reestruturação subcelular das organelas citoplasmáticas e os processos moleculares como a ativação e inibição de rotas bioquímicas (BLANCO *et al.*, 2011).

Por outro lado, a condição de saúde geral e reprodutiva da doadora também influencia o processo da aquisição de competência de seus gametas, seja pela ciclicidade e/ou momento da coleta, levando-se em consideração o estágio da onda folicular e o grau de atresia dos folículos durante a coleta (HENDRIKSEN *et al.*, 2000).

A aquisição da competência ocorre de maneira gradual e sincronizada com os eventos foliculares, durante o crescimento oocitário (BEVERS *et al.*, 1997), visto que o desenvolvimento do folículo e o respectivo oócito são eventos paralelos e relacionados funcionalmente (AGUILLAR *et al.*, 2004; CHIAN *et al.*, 2002).

Já foi demonstrado por Vassena *et al.* (2003) que, ao quinto dia da emergência da onda folicular, os oócitos utilizados para PIV proporcionam maior taxa de blastocistos quando comparado com os dias 2, 3 e 7.

O desenvolvimento da competência de oócitos é realizado progressivamente no interior do folículo (GOOVAERTS *et al.*, 2010). Foi sugerido por Gordon (2003) que quanto maior o folículo, maior a competência do oócito em desenvolver-se em embrião, excluindo-se condições patológicas como cistos foliculares. Para este autor e Vassena *et al.* (2003), folículos com tamanhos variando entre 3 e 8 mm possuem oócitos de igual capacidade para realizar a MIV, proporcionar a FIV e o CIV até o estágio de blastocisto.

No entanto, essa observação, não necessariamente, implica em que o oócito será capaz de suportar a futura embriogênese (FENG *et al.*, 2007).

Em bovinos, oócito e folículo crescem em paralelo até que o folículo atinja 3 mm de diâmetro, a partir deste diâmetro o folículo continua crescendo até a ovulação, que ocorre entre 15-20 mm, enquanto a dimensão do oócito se estabiliza em um platô entre 120 e 130  $\mu\text{m}$  de diâmetro (FAIR, 2013).

A habilidade de oócitos bovinos de diferentes tamanhos em completar o processo de MIV foi previamente avaliado por Fair et al. (1995). Estes autores demonstraram que oócitos com tamanho igual ou superior à 110  $\mu\text{m}$  possuíam maior probabilidade de chegar à fase de metáfase II.

Um dos aspectos que afetam a competência do gameta e o desenvolvimento embrionário inicial é a morfologia do mesmo, sendo destacado a homogeneidade do citoplasma, a condição das camadas do *Cumulus* (compactação e número) e o diâmetro do oócito.

A morfologia do complexo *Cumulus*-oócito afeta a competência do gameta. O número de camadas e a condição de compactação das células do *Cumulus* já foi amplamente investigado em diferentes espécies, como por exemplo: bovinos (KELLY *et al.*, 2007), ovinos (DAVACHI *et al.*, 2012), bubalinos (WARRIACH & CHOCHAN, 2004), felinos (WOOD & WILDT, 1997), caninos (RODRIGUES & RODRIGUES, 2010), equinos (OKOISKI *et al.*, 1993), dentre outros.

Diferentes questões com relação às interações celulares do complexo *cumulus*-oócito ainda não foram respondidas de forma adequada. Postula-se que oócitos com ao menos três ou mais camadas compactas de células do *Cumulus* têm maior competência em realizar a MIV com sucesso. Provavelmente, devido a troca de nutrientes e substâncias como promotores de crescimentos (DAVACHI *et al.*, 2012) ou mesmo pela transferência de moléculas regulatórias ou sinais de transcrição (RNAm) (WATSON, 2006).

Porém, as células do *Cumulus* parecem ser apenas um dos intermediadores do desenvolvimento da competência dos gametas femininos. Possivelmente, uma das alternativas que possa responder as indagações sobre a competência à maturação seja a avaliação do fluido folicular, onde se pode determinar, não invasivamente, o que é metabolizado ou liberado pelos oócitos (WALLACE *et al.*, 2012).

Em humanos, foi descrito que oócitos competentes ao desenvolvimento embrionário são provenientes de folículos com altos níveis de glicose e lipoproteína de

alta densidade (*High-density lipoprotein* - HDL), baixos níveis de lactato, glutamina, colina e metabólitos correlatos como, por exemplo, glicerolfosfatilcolina e fosfocolina. Estas observações levam a crer que as principais fontes de energia de oócitos competentes são lactato, glutamina e derivados da colina (WALLACE *et al.*, 2012).

Na tentativa de melhorar as taxas de competência oocitária, Costa *et al.* (2013) testaram a utilização de várias concentrações (0, 25, 50 e 100 nM) do hormônio triiodotironina (T3) no meio de maturação. Embora os oócitos apresentem receptores para este hormônio, não foi observada alteração na taxa desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto. Porém, a vitalidade dos blastocistos obtidos, quando foram empregadas as concentrações 50 e 100 nM, parece ter sido maior, pois houve um aumento no número de eclosões ao dia 8 do CIV.

A competência à maturação é adquirida durante a fase de crescimento folicular, logo, Dias *et al.* (2013) testaram prolongar esta fase *in vivo*. Estes pesquisadores realizaram um protocolo de superestimulação de novilhas utilizando CIDR®, prostaglandina (PGF<sub>2α</sub>), FSH e LH, e esquematizaram três grupos experimentais; um controle que recebeu oito aplicações de FSH com aplicação de PGF<sub>2α</sub> e retirada do implante de progesterona 48h após a finalização do FSH; um grupo tratamento (FSH curto) com oito aplicações sendo que, durante a sexta aplicação, os animais receberam PGF<sub>2α</sub> e o implante foi retirado; e o grupo tratamento que foi submetido a 16 aplicações de FSH (oito dias) com injeção de PGF<sub>2α</sub> e retirada do implante após 48h da finalização do FSH (grupo tratamento FSH longo). Estes autores observaram que com o tratamento prolongado de FSH foi possível aumentar a fase de crescimento folicular ( $p < 0,05$ ), ou seja, no grupo FSH longo, foram observados por doadora  $34,7 \pm 5,8$  folículos com diâmetros  $\geq 3$  mm enquanto que os tratamentos curto e padrão proporcionaram resultados semelhantes ( $p > 0,05$ ) com  $18,0 \pm 4,2$  e  $19,6 \pm 2,7$  folículos, respectivamente.

Esses tratamentos influenciaram também a taxa de blastocisto ao dia 9 pós-FIV por doadora, sendo que os grupos FSH longo e curto não diferiram ( $p > 0,05$ ), ou seja, 5,8 blastocistos por doadora (45/8) e 2,5 (20/8), respectivamente. Já o tratamento tradicional (FSH padrão) foi inferior e resultou em apenas 1,7 (8/13) blastocistos por doadora.

Em um experimento com oócitos *Mus musculus domesticus*, Kim *et al.* (2011) utilizaram três meios diferentes para realizar a MIV, sendo: o grupo A, oócitos maturados em meio de maturação comercial Sage® (CooperSurgical); grupo B, em meio de CIV (BMI, Suwon, Coreia do Sul) e o grupo C, utilizando TCM-199 (Sigma®).

Os resultados revelaram que o meio do grupo B (Meio de cultivo de blastocistos, assim denominado pelos autores) proporcionou maiores taxas de maturação dos oócitos e, conseqüentemente, um maior número de blastocistos. Através de uma análise da composição dos meios, os autores encontraram que a principal diferença foi a presença de taurina no grupo B.

De acordo Guyader-Joly *et al.* (1998), a taurina tem como precursores a cisteamina e a hipotaurina. A cisteamina é uma substância de baixo peso molecular que participa indiretamente da síntese de glutadiona pelo ciclo  $\gamma$ -glutamil em oócitos e embriões. Nestas estruturas, sabe-se que a presença de glutadiona é abundante e participa do controle redox intracelular, além de ser importante durante a fecundação. Porém, o acréscimo de cisteamina no meio de maturação não influenciou a taxa de fecundação e desenvolvimento embrionário de oócitos submetidos ao estresse térmico (NABENISHI *et al.*, 2011).

Na espécie bovina já foram realizados experimentos com objetivo de modificar a eficiência da MIV utilizando oócitos de animais pré-púberes, no entanto, estes não alteram as baixas taxas de desenvolvimento embrionário ao estágio de blastocisto (PUJOL *et al.*, 2004; DIAS *et al.*, 2013). Por outro lado, Córdova *et al.* (2010) empregando uma combinação de Insulina-Transferrina-Selênio (ITS) com Ácido Ascórbico durante a MIV, observaram um aumento significativo do número de blastocistos bovinos pós CIV.

Hu *et al.* (2011) utilizaram ITS na MIV de oócitos suínos e observaram um acréscimo na taxa de maturação citoplasmática (através de análise dos grânulos corticais) e nuclear (presença de corpúsculo polar). Os autores observaram que 1% de ITS no meio permitiu a MIV de 78,56 % (359/457) oócitos, enquanto que apenas 54,35% (231/425) dos oócitos foram maturados na ausência destas substâncias. Logo, estes autores concluíram que a utilização da ITS parece exercer função promotora da competência oocitária à MIV.

### 2.3. *Teste de Azul de Cresil Brilhante (Brilliant Cresyl Blue – BCB)*

O teste de Azul de Cresil Brilhante (BCB), por se tratar de um teste eficiente e não invasivo, é o teste bioquímico de maior utilização na avaliação da competência oocitária em diferentes espécies mamíferas (CATALÁ *et al.*, 2011).

Este teste se baseia na avaliação da atividade da enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH), que, durante a fase de crescimento do oócito tem atividade e é capaz de degradar no citoplasma o corante azul de cresil brilhante (BCB-). Por outro lado, no oócito que atingiu seu pleno crescimento, essa enzima não é mais ativa, o que faz com que a cor azul permaneça no citoplasma oocitário (BCB+).

Com o objetivo de esclarecer a atuação da enzima, diferentes pesquisadores tem buscado avaliar a atividade desta enzima nos gametas de animais de acordo com a faixa etária ou a fase reprodutiva. Por exemplo, Schepper *et al.* (1987) em um experimento bioquímico, anterior a descrição do emprego do corante como teste biológico, utilizaram oócitos puncionados de folículos e ovulados de camundongos fêmeas divididas em quatro grupos etários (4-5, 10-14, 42-44 e 52-56 semanas de vida) para medir, através de espectrofotometria dos oócitos corados com fluorescência, a atividade enzimática da G6PDH. Neste trabalho encontraram que a atividade enzimática é mais pronunciada nos oócitos foliculares e, quase nula nos ovulados, independentemente da idade do animal. Estes dados serviram para corroborar a hipótese de que os oócitos em crescimento tem maior atividade da G6PDH.

Ericsson *et al.* (1993) descreveram o primeiro uso do BCB para avaliação da competência de oócitos, em trabalho apresentado na reunião da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões em Louisiana (USA). Neste experimento, os autores utilizaram como modelo animal o suíno, e determinaram um padrão de três colorações (azul escuro, intermediário e claro) dos oócitos para a interpretação dos resultados do teste do BCB (exposição dos oócitos a 17  $\mu$ M de BCB em PBSm durante 90 min). Os resultados mostram que os oócitos escuros (azul escuro) tiveram as maiores taxas de formação de pronúcleos (40/249; 16,1%) após a fecundação, os intermediários tiveram taxas semelhantes ao controle (13/226; 5,7% e 16/341; 4,7%, respectivamente) e os claros apesar das taxas de maturação semelhante aos intermediários (4/46; 8,7% e 49/226; 21,7%, respectivamente) não desenvolveram pronúcleos (0/46).

Na espécie bovina, Pujol *et al.* (2004) reportaram que houve um aumento das taxas de embriões a partir da seleção de oócitos de novilhas através do teste BCB. Estes autores utilizaram dois grupos controles um com oócitos de novilhas e outro de vacas, além dos grupos contendo oócitos BCB+ e BCB-. O grupo em que se observou as maiores taxas de formação de blastocistos foi o controle (vacas) com 30% (36/293); o de novilhas obteve 5,2% (8/155); BCB+ 12,3% (36/293) e BCB- 1,6% (1/64). Apesar das baixas taxas de blastocistos produzidos a partir dos oócitos das novilhas, a taxa de

clivagem no grupo de BCB+ (74,5%, - 293/393) foi similar ao grupo controle de oócitos das vacas (79,4% - 150/189), o que destaca a eficiência da técnica em selecionar gametas competentes.

Buscando padronizar a técnica do BCB para seleção de oócitos competentes em caprinos pré-púberes, Rodríguez-González *et al.* (2002) testaram quatro concentrações de BCB (13, 26, 39 e 52  $\mu\text{M}$ ) diluídas em PBSm e a análise dos resultados não revelou diferença estatística entre os tratamentos. Observaram também o progresso nuclear da meiose nos oócitos BCB+, ou seja, em todos os tratamentos obtiveram entre 74% (63/85 para 52  $\mu\text{M}$  do corante) a 100% (3/3 para 13  $\mu\text{M}$ ). Para identificar a melhor concentração de BCB, os pesquisadores realizaram a FIV e encontraram que a maior taxa de oócitos fecundados (presença de uma cauda do espermatozóide no citoplasma) foi no tratamento com 26  $\mu\text{M}$  de BCB (65% - 39/60) em relação aos 39  $\mu\text{M}$  (33,3% - 13/39) e aos 52  $\mu\text{M}$  (28,6% - 12/42). Definida a concentração de BCB a ser utilizada (26  $\mu\text{M}$ ) os autores realizaram a FIV somente com oócitos assim selecionados e determinaram as taxas de estruturas com dois pronúcleos, polispérmicos (com presença de mais de uma cauda, ou mais de dois pronúcleos) e assincrônicos (presença de dois pronúcleos porém sem a descondensação do pronúcleo masculino). As taxas de polispermia e assincronia não diferiram entre os BCB+ (47,1% - 48/81 e 8,8% - 9/81), os BCB- (49,8% - 122/175 e 13,5% - 33/175) e os do grupo controle (45,3% - 72/117 e 16,4% - 26/117), respectivamente.

Apesar da grande maioria dos trabalhos fazerem alusão às vantagens do uso do teste de BCB para selecionar os oócitos com maior competência para a PIV (revisado por GOOVAERTS *et al.*, 2010); Opiela *et al.* (2010) reportaram que a identificação dos oócitos BCB+ não diferiu do grupo controle (oócitos que não passaram pelo teste de BCB) levando-se em consideração às taxas de formação de blastocistos após a MIV, FIV e CIV. Estes autores ainda revelaram que os blastocistos provenientes de oócitos que foram selecionados pelo BCB (positivos ou negativos) apresentaram maior número de células que fizeram a tradução da caspase-3 (indicador apoptótico); ou seja, a manipulação adicional dos oócitos durante o teste fez com que algumas células da massa celular interna entrassem em apoptose. No entanto, a atividade da caspase-3 pode estar ligada à homeostase e é considerada um dos principais reguladores da pluripotência celular, ou seja, pode estar envolvida no processo de diferenciação celular, como demonstrado com as células tronco embrionárias (Fujita *et al.*, 2008).

As rotinas conduzidas em laboratórios de pesquisa ou de produção *in vitro* comercial de embriões bovinos revelam uma tendência a se referirem à qualidade dos oócitos BCB+, esquecendo assim, de levar em consideração o emprego adequado dos BCB-. Porém, acreditamos que uma metodologia baseada no fornecimento das necessidades básicas do metabolismo dos BCB- poderia incrementar os resultados na PIV. Para isso deveríamos buscar as razões pelas quais os BCB- não são competentes para realizarem a MIV. Uma das justificativas bastante citadas em relação aos oócitos BCB- de diferentes espécies, que apresentam baixas taxas de maturação e que proporcionam reduzidas taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro*, seria a falta de sincronidade entre a maturação nuclear e citoplasmática como demonstrado por Silva *et al.* (2011).

### 3. ARTIGO 1

#### **Non-competent oocytes negative impact on competent oocytes capacity to undergoing in vitro maturation, fertilization and embryo development.**

*M.B. Salviano<sup>1</sup>, F.J.F. Collares<sup>1</sup>, B.S. Becker<sup>1</sup>, B.A. Rodrigues<sup>1</sup>, J.L. Rodrigues<sup>1,2</sup>*

Laboratory of Embryology and Biotechniques of Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

All correspondence to José Luiz Rodrigues. Laboratory of Embryology and Biotechniques of Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, UFRGS; Cx. Postal 15004, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brasil. Tel: +55 51 33086-126. Email: [joseluiz.rodrigues@ufrgs.br](mailto:joseluiz.rodrigues@ufrgs.br).

Laboratory of Embryology and Biotechniques of Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, UFRGS, Brazil.

#### **Summary**

Competent oocyte selection is still a bottleneck in *in vitro* production (IVP) of mammalian embryos. Different indirect approaches are employed to identify oocyte competence to go through in vitro maturation (IVM), in vitro fertilization (IVF) and to promote in vitro embryo development (IVC) until the blastocyst stage, and almost all described procedures are so invasive or even lethal, that it is impossible to use them in the laboratory routine work. Among the vital assays described to select competent oocytes for IVP, the brilliant cresyl blue (BCB) test showed consistent results. The aim of the experiment was to determine the cleavage and blastocyst rates obtained from BCB+ submitted to IVM in presence of BCB- on proportion of 10:1, respectively. Cumuli-oocytes complex (COCs) were recovered from slaughterhouse-derived ovaries and after morphological evaluation were randomized into two groups: submitted to IVM: directly (1) or holding (2) as control, and submitted to BCB test before IVM. After the BCB test the COCs were classified into BCB+ (blue cytoplasm) or BCB- (colourless cytoplasm) and then divided into more four experimental groups (3) BCB+, (4) BCB-, (5) BCB+ matured in same IVM medium drop of (6) BCB- on ratio 10:1,

respectively. After IVM (24h) oocytes from the different experimental groups were submitted to IVF and IVC under same culture conditions until they have reached the blastocyst stage (D7). Regarding the cleavage rate (48h after IVF) only group 4 (102/229 – 44%) differed ( $p < 0.05$ ) from the others groups [2 (145/241 – 60%) 1 (48/80 – 60%); 3 (150/225 – 67%); 5 (201/318 – 63%) and 6 (21/33 – 63%)]. On Day 7, the embryos of group 3 (BCB+) achieved the highest blastocysts rate (46/150 – 31%) ( $p < 0.05$ ) when compared to the embryo development capacity of the others experimental groups (1: 10/48 – 21%; 2: 31/145 – 21%, group 4: 17/102 – 17%, group 5: 46/201 – 23% and group 6: 2/21 – 10%). In conclusion, the presence of non-competent oocytes during IVM impaired the capacity of competent oocytes to undergo IVM and subsequently IVF and IVC even in low proportion (1:10).

### **Introduction**

Many factors can be responsible to success of IVP but one of the most important is the quality of gametes (Camargo et al., 2006). To improve blastocyst rate research has been done trying to identify a more precise selection method to identify competent oocytes, using many tools like molecular biology, fluorescent stains, metabolomics and proteomics (reviewed by Budowska et al., 2011).

Competent oocytes selection is still a bottleneck in IVP of mammalian embryos. Different indirect approaches are employed to identify oocyte competence to go through IVM, IVF and to promote IVC until the blastocyst stage. In general, these techniques despite great accuracy often are invasive and usually cause cell's death. Therefore, the morphological selection of oocytes is still commonly used in most IVP laboratories.

However, a promising technique was described by Ericsson et al. (1993) based on activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), selecting porcine oocytes. The G6PDH activity degrade the stain brilliant cresyl blue (BCB), allowing to identify oocytes with or without enzyme activity (BCB-test). Different studies showed the efficiency of BCB-test to identify competent oocytes to undergo IVM in goats (Rodríguez-González et al., 2003), cows (Pujol et al., 2004; Alm et al., 2005, Silva et al., 2011), buffalo (Manjunatha et al., 2007), bitches (Rodrigues et al., 2009), rats (Alcoba et al., 2011) and, sheep (Wang et al., 2012).

Immature oocytes synthesize a variety of proteins, including G6PDH. This enzyme, a component of the pentose phosphate cycle, is active in the growing oocyte, but is relatively less active in oocytes that have completed growth (Janowski et al., 2012; Gutnisky et al., 2013).

The population of bovine oocytes from slaughterhouse-ovaries are not homogeneous (Ferreira et al., 2009), and an interesting point is the proportion of BCB+ and BCB- after morphological pre-selection (grade 1 and 2 oocytes). Generally, the percentage of competent oocytes (BCB+) ranges from 57.9 to 66.5% (Pujol et al., 2004; Alm et al., 2005, Silva et al., 2011; Janowski et al., 2012; Castaneda et al., 2013; Mirshamsi et al., 2013).

Silva et al. (2011) have described in bovine oocytes different patterns of nuclear and cytoplasmic maturation during IVM between BCB+ and BCB-. The BCB+ oocytes undergo IVM showing a synchronous nuclear and cytoplasmic maturation, different of BCB- oocytes that go through IMV showing an asynchronous pattern among nuclear and cytoplasmic maturation.

Usually oocyte competence is defined as the ability to rightly progress through maturation, cleave following fertilization and support embryo development to blastocyst stage (Brevini-Gandolfi & Gandolfi, 2001; Blanco et al., 2011). Many factors could affect the female gamete competence, as ovarian morphology, follicular environment, actions of hormones or growth factors, oocyte diameter and culture media (Camargo et al., 2006).

Considering these observations we hypothesized that the presence of BCB- into the same environment as the BCB+ during IVM (same medium drop) impaired the BCB+ competence to undergo IVM, IVF and IVC. Then, the present study aimed to determine the cleavage and blastocyst rates of competent oocytes in presence of non-competent in a proportion of 10:1.

## **Material and Methods**

### *Chemicals and media*

The media for IVM, IVF and IVC were gently obtained from Biotecnologia Animal<sup>®</sup> (Brasília, Brazil). The foetal calf serum (FCS) was purchased from Nutricell<sup>®</sup> (Campinas, SP, Brazil). The modified PBS and BCB stain solutions were assembled in

our laboratory using ultrapure water system (Millipore, Bedford, MA, USA) and chemicals purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) unless specifically stated otherwise.

#### *Oocyte collection*

Bovine ovaries were obtained from a local slaughterhouse and transported to the laboratory within 3h after slaughter in mPBS and maintained at 32-34°C. The ovaries were washed three times in mPBS maintained at 35°C. *Cumuli*-oocytes complexes (COCs) were aspirated from follicles (2 to 8 mm in diameter) using 18-gauge needle fixed to a 10 mL disposable syringe. Subsequently, the *pellet* was re-suspended in mPBS added 0.4% BSA and observed in stereomicroscope (15x) to recover COCs. Only COCs with a compact *cumulus* mass with more than three layers were selected for the experiment (morphological selection – grades 1 and 2). After collection, the COCs were first divided into two groups: control group and submitted to BCB-test. In three replicates, to verify possibly deleterious effects of the BCB test procedure, the control group oocytes was subdivided into two more groups, one submitted immediately to IVM and the other maintained into mPBS at room temperature (22 °C) during BCB-test.

#### *Brilliant Cresyl Blue test (BCB-test)*

Selected oocytes were exposed to brilliant cresyl blue (BCB) stain. Briefly, they were washed three times in mPBS added with 26 µM of BCB stain solution and then transferred into 35 mm plastic petri dishes containing 3 mL of BCB stain solution and maintained during 90 min at 38.5°C in incubator with atmospheric air and saturated humidity. After this time oocytes were washed three times in mPBS and then selected by cytoplasm colour, blue (BCB+) or colourless (BCB-). After classification into BCB+ and BCB-, the oocytes were randomly distributed in four experimental groups: BCB+, BCB-, and two others groups of BCB+ and BCB- on 10:1 proportion matured in same IVM medium drop (separated by glass microcapillary closed by fire – figure 1).

#### *In vitro maturation (IVM)*

The oocytes of all groups were washed three times in IVM medium (Bio Biotecnologia Animal<sup>®</sup>, Brasília, Brazil) added with 10% FBS and cultured in drops containing 3  $\mu$ L of IVM medium per oocyte, under mineral oil during 24h into an incubator at 38.5°C with an atmosphere containing 5% of CO<sub>2</sub> in air and saturated relative humidity. To permit the evaluation of paracrine influence of BCB- over BCB+ the oocytes were matured into the same IVM drop where they remain separated by a closed glass microcapillary, to permit posterior identification (figure 1).

#### *In vitro fertilization (IVF)*

Straw (0.5 mL) containing bovine semen previously IVP tested was thawed and immediately evaluated to motility and vigour. After that, spermatozoa were selected by swim-up procedure, on other words semen was divided in two parts (about 240  $\mu$ L) and each part were gently placed on bottom of falcon's tube (15 mL) contain 1 mL Sperm Selection Medium (SSM: Bio Biotecnologia Animal<sup>®</sup>, Brasilia, Brazil). After 1h, 900  $\mu$ L supernatant medium of both tubes were mixed and washed in 1 mL SSM and then centrifuged at 300 g for 10 min. The pellet was collected and diluted in IFV medium (Bio Biotecnologia Animal<sup>®</sup>, Brasilia, Brazil) and exposed for 15 min to a HHE solution to induce sperm capacitation into an incubator at 38.5°C in atmosphere containing 5% of CO<sub>2</sub> in air and saturated relative humidity. While spermatozoa were capacitated, the COCs were washed three times in in IVF medium and placed into IVF drops medium (80  $\mu$ L) under mineral oil according to each experimental groups. To the IVF drops medium containing the COCs were added 1 x 10<sup>6</sup> spermatozoa, and co-cultured (D0) during 22 h at 38.5°C in atmosphere containing 5% of CO<sub>2</sub> in air and saturated relative humidity.

#### *In vitro culture (IVC)*

After IVF, presumptive zygotes were stripped of *cumulus*-cells and placed into 100  $\mu$ L of IVC medium (Biotecnologia Animal<sup>®</sup>, Brasilia, Brazil) and cultured during 7 days at 38.5°C in atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> and saturated humidity.

Fourth hours after IVF cleavage rate was observed and all 2-cells embryos were cultured on same drop on well-of-the-well system until reach the blastocyst stage (D7).

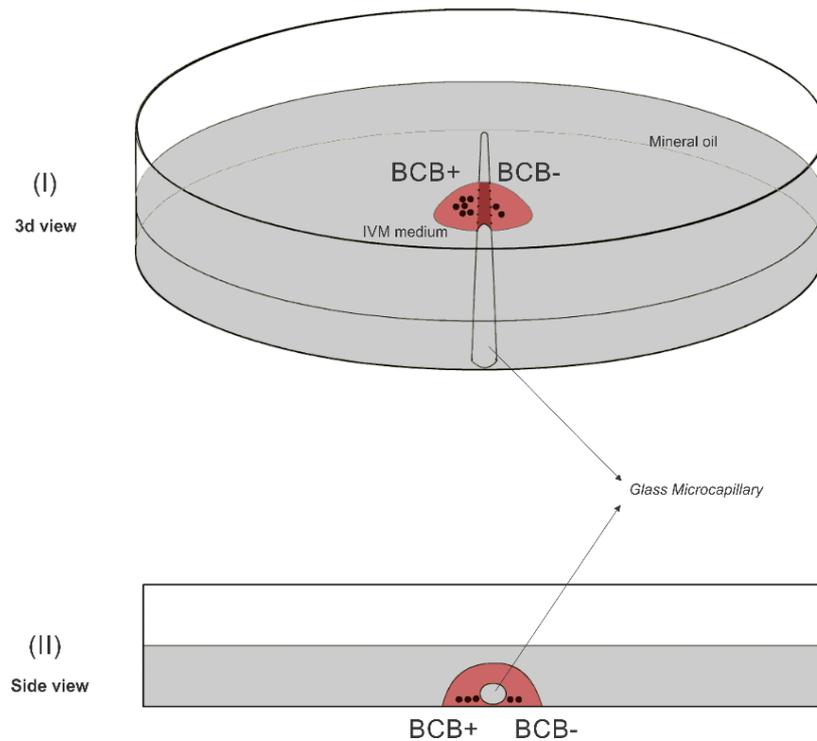


Figure 1 – Scheme of IVM where BCB+ were maintained separate from BCB- oocytes using the same medium drop. To confection a closed glass microcapillary, the extremities were closed by fire, after that the microcapillary was sterilized by fire and then it was gently placed into the medium drop (80  $\mu$ L) under mineral oil. This procedure allow to divide the drop environment into two compartments (I), having a communication between them on top of drop (II).

### *Statistical Analysis*

Nine replicates of IVP were accomplished and data analysis was performed by using Statistical Analysis Software 9.1. (SAS Institute, Cary, NC). The proportion of BCB+ and BCB- oocytes were expressed as 95% confidence intervals. Cleavage data were tested by Chi Square test ( $p=0.05$ ) and blastocysts data tested by Fisher's test ( $p=0.05$ ).

### **Results**

The first experiment was conducted (three replicates) to verify the effect of BCB test on the further viability of bovine oocytes to undergo IVM, IVF and IVC. Were used two control groups (oocytes submitted directly IVM and oocytes holding at room temperature) and both BCB (+ and -) selected oocytes (table 1).

Table 1 – Influence of BCB test on further development of bovine oocytes

	COCs		Cleavage		Blastocysts	
	N	N	%	N	% (Cleaved)	
Directly IVM	80	48	60,0	10 <sup>b</sup>	20,8	
Control	77	45	58,4	8 <sup>b</sup>	17,8	
BCB+	66	45	68,2	14 <sup>a</sup>	31,1	
BCB-	74	38	51,4	4 <sup>b</sup>	10,5	

a:b =  $p \leq 0.05$

Although the cleavage rates are similar among the oocytes of different groups, the table 1 data shows that the oocytes classified as BCB+ were more competent to promote the embryo development to the blastocyst stage.

Based on the first experiment results, were oocytes directly submit to IVM showed similar cleavage and embryo development rates to the blastocyst stage, this control group was not more replicate in the subsequent experiment.

In the second experiment after morphological selection a total of 805 COCs were exposed to BCB stain and 543 (67.5%) of them maintained the blue stain on cytoplasm (BCB+) and 262 (32.5%) were classified as colourless cytoplasm (BCB-) (table 2).

Table 2 – Cleavage and embryo development of BCB+ in presence of BCB- bovine oocytes.

Groups	COCs		Cleavage		Blastocysts	
	N	N	%	N	% (Cleaved)	
Control	241	145 <sup>a</sup>	60.2	31 <sup>a</sup>	21.4	
BCB+	225	150 <sup>a</sup>	66.7	46 <sup>b</sup>	30.7	
BCB-	229	102 <sup>b</sup>	44.5	17 <sup>a</sup>	16.7	
Paracrine BCB+	318	201 <sup>a</sup>	63.2	46 <sup>a</sup>	22.9	
Paracrine BCB-	33	21 <sup>a</sup>	63.6	2 <sup>a</sup>	9.5	

a:b =  $p \leq 0.05$

Table 2 shows the oocyte capacity to achieve cleavage and to promote the embryo development to the blastocyst stage. Considering the cleavage rate, only BCB-

(102/229; 44.5%) was lower than the others experimental groups. Looking at the blastocyst rates the BCB+ oocytes that were submitted to IVM alone, without BCB-paracrine effects, shows the highest number of blastocysts (46/150; 30.7%). Among the others oocyte groups it was no difference in the capacity to reach the blastocyst stage.

## Discussion

The last two decades has seen many research efforts to achieve higher efficiency in bovine IVP technologies. Despite these enormous scientific work the field results, it means more calves´ born/collected oocytes could not be reached (Fair, 2010, Blanco et al. 2011). One decisive point is the recognition of oocyte competence (Camargo et al., 2006) and until today, there are no safe ways to achieve this goal. The use of BCB stain to select competent oocytes showed efficacy and repeatability, working with different species like goats (Rodríguez-González et al., 2003), cows (Pujol et al., 2004; Alm et al., 2005, Silva et al., 2011), buffalo (Manjunatha et al., 2007), bitches (Rodrigues et al., 2009), rats (Alcoba et al., 2011), sheep (Wang et al., 2012).

The first experiment showed that the oocytes submitted directly to IVM or exposed to same conditions like oocytes submitted to BCB test do not differ in their ability to support embryo development to the blastocyst stage (table 1). This observation corroborate the data published by Alm et al. (2005), where these authors also did not found difference between bovine oocytes capacity to go through IVM, IVF and IVC from control group directly *in vitro* matured and holding group, where oocytes were maintained in identical conditions as the oocytes submitted to BCB test. Then, based on first experiment results the second one was design using as control only the group of oocytes maintained into the same BCB test environment conditions.

Considering the population of bovine oocytes obtained from slaughterhouse-derived ovaries are not homogeneous (Ferreira et al., 2009) regarding oocyte morphological aspect, and the percentage of BCB+ oocytes present in these pools is little variable, around 60% (Pujol et al., 2004; Alm et al., 2005, Silva et al., 2011; Janowski et al., 2012; Castaneda et al., 2013; Mirshamsi et al., 2013).

The experiments conducted in our laboratory, like Silva et al. (2011) observed 65% of BCB+, similar to the results obtained in this experiment 67%, this ratio 1:2 of non-competent versus competent oocytes is always present into pools of ovaries collected oocytes. When we deviated artificially this percent to 90% of BCB+ oocyte,

trying to induce competence on BCB- oocytes (paracrine effect), we have observed that the cleavage rate was reduced in the group of oocytes BCB- matured alone, when compared to the cleavage rates of the control group, BCB+ oocytes matured alone, BCB- and BCB+ oocytes matured in same IVM drop (table 2). However, looking at the embryo development rate to the blastocyst stage the BCB+ oocytes submitted to IVM alone showed the highest blastocyst number, different of the BCB+ oocytes that were submitted to IVM in the same environment of BCB- oocytes, on a proportion 10:1, respectively. These data suggested one possible negative paracrine effect from BCB- impairing the development capacity of BCB+ to support embryo development to the blastocyst stage (table 2).

Different approaches proved the autocrine and paracrine effects of COCs driving the bovine oocyte throughout IVM. Elegant experiment conducted by Sutton et al. (2003) showed the relationships among oocytes and their cumulus cells. These observations not exclude the paracrine effect among different oocytes.

Our first intention was to observe the influence of BCB+ over the BCB- ability to achieve competence to undergo IVM. The experiment was design to observe the development capacity of BCB+ and BCB- submitted to identical IVM conditions, maintained in the same medium drop, respecting a ratio of 10:1, respectively. Regarding the results on table 2, the BCB- oocytes submitted alone to IVM, showed a cleavage rate significantly lower (44.5%) than the others groups (63 to 67%). Pujol et al. (2004), Janowski et al. (2012) and Mirshamsi et al. (2013) have described similar results, lower cleavage rates of BCB- oocytes than BCB+.

However, looking at the embryo development rate to the blastocyst stage (table 2) the BCB+ oocytes submitted to IVM alone showed the highest blastocyst percentage (30.7%), different of the BCB+ oocytes that were submitted to IVM in the same environment of BCB- oocytes, on a proportion 10:1, respectively. These data suggested one possible negative paracrine effect from BCB- impairing the development capacity of BCB+ to support embryo development to the blastocyst stage.

Looking the oocyte capacity (BCB+ or BCB-) to promote IVM, IVF and IVC our data were similar to the data described by different authors (Pujol et al. (2004), Alm et al. (2005), Silva et al. (2011); Janowski et al. (2012) and Mirshamsi *et al.* (2013), who published embryo development rates to the blastocyst stage ranges from 12.3 to 35.7% using BCB+ oocytes. These percentages are higher when compared to the

embryo development capacity obtained using BCB- oocytes (1.6 to 16.5%). These authors do not have tested the paracrine effect among oocytes classified BCB+ or BCB.

The presence of BCB- oocytes during IVM, even in lower ratio in relationship to BCB+ could release into the medium different factors, non-detected by morphological assessment, to influence negatively the competence of BCB+ oocytes to undergo IVM, IVF or IVC. Among these unknown substances, we can take into account the presence of apoptotic factors.

The apoptotic factors have a controversial role on oocyte maturation, this physiologic cell death path is usually described as negative (Warzych et al., 2013), but on the other hand it also plays an important role influencing oocyte developmental competence in the surrounding follicular cells (Opieła et al., 2008) and stimulating the oocytes to acquire developmental competence (Janowski et al., 2012).

However, the oocyte capacity to acquire competence can be affected only when a threshold of apoptosis (certain, still undefined apoptotic index) is surpassed (Zeuner et al., 2003). Recently Warzych et al. (2013) showed that there is no relationship between COCs morphology and cumulus cells apoptotic index.

Opieła et al. (2008) carried out an experiment to determine the relationship among apoptotic (Bax), anti-apoptotic (Bcl-2) genes and G6PDH activity. They observed that grown oocytes have lower levels of Bax expression than non-competent oocytes; on the other hand, Bcl-2 expression levels were similar between them. It is important to point out that observation was only on transcript levels, the authors could not identify on protein level.

On the contrary, Janowski et al. (2012) working with granulosa cells gene expression, have observed that competent oocytes show an increased degree of late apoptotic events in these cells when compared to non-competent oocytes. Taking these both observations into account our data suggest a possible apoptotic cascade occurring in non-competent oocytes could induce the same phenomenon into competent oocytes, inhibiting their further developmental capacity.

Our results showed, despite higher proportion of BCB+ oocytes in relationship to BCB- oocytes into IVM drop (10:1, respectively), the BCB+ oocytes capacity to promote embryo development to reach the blastocyst stage decreases significantly.

In conclusion, submitting BCB+ oocytes separated from BCB- during IVM increase the embryo development rate to the blastocyst stage, when compared to the control group.

The presence of non-competent oocytes during IVM impaired the capacity of competent oocytes to undergo IVM and subsequently IVF and IVC even in low proportion (1:10).

## References

Alcoba, D.D., Braga, B.L.R., Sandi-Monroy, N.L., Proença, L.A., Lopes, R.F.F. & Oliveira, A.T.D. (2011). Selection of *Rattus norvegicus* oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining. *Zygote* 21(3), 238-45.

Alm, H., Torner, H., Lohrke, B., Viergutz, T., Ghoneim, I.M. & Kanitz, W. (2005). Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology* 63, 2194-205.

Blanco, M.R., Demyda, S., Moreno Millán, M. & Genero, E. (2011) Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: a review. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 6(7), 155-65.

Brevini-Gandolfi, T. & Gandolfi, F. (2001). The maternal legacy to the embryo: Cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology* 55, 1255-76.

Bukowska, D., Kempisty, B., Piotrowska, H., Walczak, R., Sniadek, P., Dziuban, J., Brussowm, K.P., Jaskowski, J.M., Nowicki, M. (2011) The invasive and new non-invasive methods of mammalian oocyte and embryo quality assessment: a review. *Veterinarni Medicina* 57(4), 169-76.

Camargo, L.S.A., Viana, J.H.M., Sá, W.F., Ferreira, A.M., Ramos, A.A. & Vale Filho, V.R. (2006) Factors influencing *in vitro* embryo production. *Animal Reproduction* 3(1), 19-28.

Castaneda, C.A., Kaye, P., Pantaleon, M, Phillips, N., Norman, S., Fry, R. & D'Occhio, M.J. (2013) Lipid content, active mitochondria and brilliant cresyl staining in bovine oocytes. *Theriogenology*, 79, 417422.

Ericsson, S.A., Boice, M.L., Funahashi, H. & Day, B.N. (1993). Assessment of porcine oocytes using brilliant cresyl blue. *Theriogenology*, 39, 214.

Fair, T. (2010). Mammalian oocyte development: Checkpoints for competence. *Reproduction, Fertility and Development* 22(1), 13-20.

Ferreira, E.M., Vireque, A.A., Adona, P.R., Meirelles, F.V., Ferriani, R.A. & Navarro, P.A.A.S. (2009). Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 71, 836-48.

Gutnisky, C., Dalvit, G.C., Thompson, J.G. & Cetica, P.D. (2013) Pentose phosphate pathway activity: Effect on in vitro maturation and oxidative status of bovine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development* 25(7), 1026-35.

Janowski, D., Salilew-Wondim, D., Torner, H., Tesfaye, D., Ghanem, N., Tomek, W., El-Sayed, A., Schellander, K. & Hölker, M. (2012). Incidence of apoptosis with transcript abundance in bovine follicular cells is associated with quality of the enclosed oocyte. *Theriogenology* 78, 656-669.

Manjunatha, B.M., Gupta, P.S.P., Devaraj, M., Ravindra, J.P. & Nandi, S. (2007). Selection of developmentally competente buffalo oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM. *Theriogenology* 68, 1299-1304.

Mirshamsi, S.M., KaramiShabankareh, H., Ahmadi-Hamedani, M., Soltani, L., Hajarian, H. & Abdolmohammadi, A.R. (2013) Combination of oocyte and zygote selection by brilliant cresyl blue (BCB) test enhanced prediction of developmental potential to the blastocyst in cattle. *Animal Reproduction Science* 136, 245-251.

Opiela, J., Katska-Ksiazkiewicz, L. (2013) The utility of brilliant cresyl blue (BCB) staining of mammalian oocytes used for in vitro embryo production (IVP). *Reproductive Biology* 13, 177-183.

Opiela J, Katska-Ksiazkiewicz L, Lipinski D, Słomski R, Bzowska M & Rynska B. (2008) Interactions among activity of glucose cose-6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax, and developmental competence following IVP in cattle. *Theriogenology* 69, 546–55.

Pujol, M., López-Béjar, M. & Paramio, M.T. (2004). Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology* 61, 735-744.

Rodrigues, B.A., Rodriguez, P., Silva, A.E.F., Cavalcante, L.F., Feltrin, C. & Rodrigues, J.L. (2009) Preliminary study in immature canine oocytes stained with brilliant cresyl blue. *Reproduction in Domestic Animals* 44(2), 255-258.

Rodríguez-González, E., López-Béjar, M., Izquierdo, D. & Paramio, M.T. (2003). Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue and matured with cysteamine supplementation. *Reproduction, Nutrition and Development* 43, 179-187.

Silva, D.S., Rodriguez, P., Galuppo, A., Arruda, N.S. & Rodrigues, J.L. (2011). Selection of bovine oocytes by brilliant cresyl blue staining: effect on meiosis progression, organelle distribution and embryo development. *Zygote* 21(3), 250-55.

Suttom, M.L., Cetica, P.D., Beconi, M.T., Kind, K.L., Gilchrist, R.B. & Thompson, J.G. (2003). Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. *Reproduction* 126, 27-34.

Wang, L., Lin, J., Huang, J., Wang, J., Zhao, Y. & Chen, T. (2012). Selection of ovine oocytes by brilliant cresyl blue staining. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012, p.1-7 <http://dx.doi.org/10.1155/2012/161372>.

Warzych, E., Pers-Kamczyc, E., Krzywak, A., Dudzinska, S. & Lechniak, D. (2013). Apoptotic index within cumulus of bovine oocytes matured in vitro. *Reproductive Biology* 3, 82-87.

Zeuner, A., Müller, K., Reguszynski, K. & Jewgenow, K. (2003). Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during in vitro maturation. *Theriogenology* 59, 1421-1433.

## 4. ARTIGO 2

### Competência de oócitos bovinos BCB- após 30 horas de MIV

M.B. Salviano<sup>1</sup>, F.J.F. Collares<sup>1</sup>, B.S. Becker<sup>1</sup>, B.A. Rodrigues<sup>1</sup>, J.L. Rodrigues<sup>1</sup>

Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução, Faculdade de Veterinária,  
UFRGS, Porto Alegre, Brasil

#### Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar as taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário ao sétimo (D7) e oitavo dia (D8) de CIV de oócitos com atividade da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (BCB-) maturados *in vitro* por 30 h. Oócitos bovinos obtidos a partir de ovários de abatedouro foram divididos em dois grupos: controle e tratamento (submetidos ao teste BCB), posteriormente os oócitos do grupo experimental foram subdivididos em quatro grupos; BCB+ e BCB- submetidos à MIV por 24h (BCB<sup>+</sup><sub>24h</sub>, BCB<sup>-</sup><sub>24h</sub>) e BCB+ e BCB- maturados *in vitro* por 30h (BCB<sup>+</sup><sub>30h</sub>, BCB<sup>-</sup><sub>30h</sub>). Após a MIV todos os oócitos foram fecundados e cultivados *in vitro* por até oito dias. As taxas de clivagem (48h após a FIV) não diferiram entre os grupos controle (107/152 – 70%), BCB<sup>+</sup><sub>24h</sub> (165/226 – 73%) e BCB<sup>-</sup><sub>24h</sub> (102/155 – 66%) todos maturados por 24h. As taxas de clivagens observadas nos grupos experimentais BCB<sup>+</sup><sub>30h</sub> (124/208 – 60%) e BCB<sup>-</sup><sub>30h</sub> (92/143 – 64%) também não diferiram entre si. A taxa de clivagem dos oócitos do grupo BCB<sup>-</sup><sub>30h</sub> foi semelhante aos grupos de oócitos submetidos à 24h de MIV. Ao D7, foram observados maior número de blastocistos desenvolvidos a partir de oócitos BCB<sup>+</sup><sub>24h</sub> (53/165 – 32%) e de oócitos não submetidos ao teste BCB (controle: 27/107 – 25%); sendo este último, semelhante ao número de blastocistos dos grupos BCB<sup>-</sup><sub>24h</sub> (21/102 – 21%) e BCB<sup>+</sup><sub>30h</sub> (20/124 – 16%). No grupo BCB<sup>-</sup><sub>30h</sub> (10/92 – 11%) se observou número de blastocistos semelhante aos de blastocistos dos grupos BCB<sup>+</sup><sub>30h</sub> e BCB<sup>-</sup><sub>24h</sub>. Ao D8, foi observado um acréscimo de 12% de blastocistos em todos os grupos. Podemos concluir que oócitos BCB- não foram afetados pela MIV por 30h, porém oócitos BCB+ tiveram reduzida a capacidade de clivagem e desenvolvimento embrionário.

## Introdução

O processo de produção *in vitro* de embriões (PIV) envolve três importantes passos: maturação, fecundação e cultivo *in vitro* (MIV, FIV e CIV, respectivamente). De acordo com Fair (2014) estas etapas são eventos delimitados e independentes, sendo a eficiência da PIV um somatório do resultado alcançado em cada uma delas. No máximo 90% dos oócitos imaturos submetidos à MIV completam o processo até a fase de metáfase II (estágio no qual os oócitos são ovulados e estão aptos à fecundação); destes 80% são fecundados e somente 30 a 40% suportam o desenvolvimento até estágio de blastocisto.

Diferentes aspectos são responsáveis pelo sucesso da PIV, dentre eles podem ser destacados os fatores genéticos (materno e paterno), bem como suas interações, com ambiente folicular. Outras variáveis como o diâmetro do gameta feminino, as condições de manutenção dos animais doadores (temperatura, umidade, estação do ano), a idade da doadora, espécie e/ou raça animal além da metodologia usada no procedimento também são determinantes da eficiência da PIV (CAMARGO *et al.*, 2006).

As características morfológicas dos oócitos são os parâmetros observados com maior frequência para prever a competência destes na realização da PIV (BUKOWSKA *et al.*, 2011). Em geral, são avaliados: o diâmetro, que não deve ser inferior à 110  $\mu\text{m}$  (FAIR *et al.*, 1995), a presença e aspecto das células do *Cumulus* e a homogeneidade do citoplasma dos oócitos (VASSENA *et al.*, 2003). No entanto, estes parâmetros, por serem subjetivos, não são suficientes para prever a competência dos oócitos. A competência dos oócitos está intimamente relacionada à síntese de RNAm e as proteínas produzidas durante a fase de crescimento (MEIRELLES *et al.*, 2013), que não podem ser avaliadas através do exame visual com auxílio do esteromicroscópio. De acordo com Bukowska *et al.* (2011), estas características oocitárias só podem ser mensuradas com auxílio de técnicas de biologia molecular, usualmente invasiva e letais.

Um procedimento utilizado pela primeira vez em oócitos suínos (ERICSSON *et al.*, 1993), baseado no emprego do corante vital azul cresil brilhante (BCB – *Brilliant Cresyl Blue*) se mostrou eficiente em selecionar gametas que já haviam completado a fase de crescimento (OPIELA & KATSKA-KSAZKIEWCS, 2013).

O teste BCB tem como princípio a degradação do corante, ao penetrar a célula, pela enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Esta enzima é parte do metabolismo energético da célula, onde a glicose é oxidada à pentose através do ciclo

das pentoses que acontece com a desidrogenação enzimática da G6PDH (GUTNISCKY *et al.*, 2013).

Durante a fase de crescimento do oócito, há uma intensa atividade da G6PDH, em contraposição com sua reduzida atividade naqueles que já finalizaram esta etapa (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2003). Logo, os gametas em crescimento, após o período de exposição ao corante apresentam-se brancos ou azul claro (BCB-) enquanto oócitos prontos para serem submetidos à MIV não têm o corante degradado e apresentam-se em azul escuro (BCB+) (OPIELA & KATSKA-KSAZKIEWCS, 2013).

A utilização do teste BCB tem sido aplicada com sucesso para seleção de oócitos de várias espécies de animais domésticos (ISHIZAKI *et al.*, 2009; RODRÍGUEZ-GONZÁLES *et al.*, 2003; PUJOL *et al.*, 2004; ALM *et al.*, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2009; ALCOBA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2012).

Em um experimento conduzido em nosso laboratório, Silva *et al.*, (2011) observaram que os oócitos BCB+ ao serem submetidos à MIV, concluem de maneira sincrônica as maturações nuclear e citoplasmática diferentemente dos oócitos BCB-.

Logo, os objetivos deste trabalho foram avaliar a maturação prolongada (30h) de oócitos não-competentes (BCB-) através das taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário inicial.

## **Material e métodos**

### *Meios e reagentes*

Os meios de MIV, FIV e CIV foram cedidos gentilmente pela Biotecnologia Animal® (Brasília, DF, Brasil). O PBS e as soluções de coloração BCB foram preparadas utilizando produtos Sigma (St. Louis, MO, USA) utilizando água purificada pelo sistema Direct-Q3/Milli-Q synthesis (Millipore, Bedford, MA, USA) e, por fim, o soro fetal bovino foi adquirido da Nutricell® (Campinas, SP, Brasil).

### *Obtenção dos ovócitos*

Ovários bovinos foram coletados no frigorífico Rost de São Leopoldo (RS) e transportados até o laboratório em recipiente térmico contendo PBS (PBS), aquecido à 33°C. Os complexos *cumuli*-oócitos (CCOs) bovinos foram recuperados mediante punção de folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm, com auxílio de uma agulha de 14G, acoplada a uma seringa descartável. Durante a punção o líquido folicular juntamente

com os CCOs foi mantido em banho-maria à 37°C e, finalmente permaneceu por 15 min para decantação. O sedimento (*pellet*) foi então transferido para placas de Petri de 90 mm contendo PBS acrescido de 0,4% de albumina sérica bovina (BSA) (PBSm) para recuperação dos CCOs, sob estereomicroscópio (15x). Os CCOs foram transferidos para placas de Petri de 35 mm contendo meio de manipulação (bancada) (Biotecnologia Animal®, Brasília, DF, Brasil) onde foram selecionados quanto a viabilidade.

#### *Teste de BCB*

O *pool* de CCOs submetido ao teste de BCB foi, primeiramente, lavado três vezes em solução corante [PBS acrescido de 0,4% de BSA e 26 µM de BCB (B5388)] e mantido em uma placa de Petri de 35 mm contendo 3 mL da solução de coloração em estufa (38,5°C com umidade relativa do ar atmosférico saturada). Após 90 minutos de incubação, os CCOs foram lavados em três gotas de PBS acrescido de 0,4% de BSA, seguido de exame ao estereomicroscópio (15x) sob luz incidente com posterior classificação de acordo com a coloração do citoplasma como proposto por Silva *et al.* (2011); ou seja, BCB+ CCOs onde o citoplasma do oócito apresentava-se azul e BCB- para oócitos com citoplasma incolor.

#### *Maturação in vitro*

Os CCOs previamente selecionados foram lavados em três gotas de meio de maturação (Biotecnologia Animal®, Brasília, DF, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco®) e, conseqüentemente, submetidos à MIV em gotas sob óleo mineral (M8410), com a densidade de um CCOs em 5 µL de meio por grupo experimental, durante 24h ou 30h de acordo o delineamento experimental.

#### *Fecundação in vitro*

Após a maturação, os oócitos foram lavados três vezes e transferidos para gotas de 80 µL de meio FIV (Biotecnologia Animal®, Brasília, DF, Brasil). Uma hora antes do final do período de maturação, uma palheta (0,5 mL) sempre da mesma partida de sêmen *Bos taurus taurus* foi descongelada em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Após o descongelamento, o conteúdo da palheta foi fracionado em dois ( $\pm$  240 µL) e depositado sob 1,0 mL de meio de seleção de espermatozóides (Biotecnologia Animal®, Brasília, DF, Brasil), em um tubo cônico de 15 mL mantido a 37°C, em estufa, durante uma hora para seleção espermática pelo processo de migração

ascendente (*swim-up*). Ao final deste período, 900  $\mu$ L do sobrenadante foram coletados e depositados em outro tubo cônico para promover a concentração dos espermatozóides mediante centrifugação, durante 10 minutos a 420 g. O *pellet* formado foi suspenso em meio de fecundação, obtendo-se uma dose inseminante de  $1 \times 10^6$  espermatozóides/mL. Após a inseminação (D0), os oócitos foram incubados com os espermatozóides por 20 horas, nas mesmas condições atmosféricas da MIV.

#### *Cultivo in vitro*

Após a fecundação, as estruturas foram transferidas para o meio de manipulação, para remoção das células do *Cumulus oophorus*, mediante pipetagem. As estruturas recuperadas foram lavadas três vezes e transferidas para o meio de cultivo (Biotecnologia Animal<sup>®</sup>, Brasília, DF, Brasil) acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado (Nutricell<sup>®</sup>, Campinas, SP, Brasil). Os presumíveis zigotos foram cultivados em gotas de 80  $\mu$ L, sob óleo mineral a 38,5°C em estufa de cultivo com atmosfera de 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub>. Após 48h do início da FIV, foi realizada a avaliação da clivagem e ao sétimo e oitavo dias as taxas de blastocistos (D7).

#### *Análise estatística*

Os resultados foram computados em tabela eletrônica e avaliados pela análise de tabela de contingência utilizando o teste de qui-quadrado, sendo considerado  $p < 0,05$  como diferença significativa.

### **Resultados**

Foram realizadas cinco repetições empregando-se 716 oócitos, destes 114 no grupo controle e 602 submetidos ao teste BCB. Dos oócitos submetidos ao teste BCB, 356 apresentaram o citoplasma azul (BCB+) ou seja, 59,1%; enquanto, 246 (40,9%) citoplasma incolor (BCB-).

A tabela 1 apresenta as taxas de clivagens e desenvolvimento embrionário ao estágio de blastocisto (D7). Pôde-se observar que, a taxa de clivagem dos oócitos submetidos à 24h de MIV (grupos controle, BCB<sub>+24h</sub> e BCB<sub>-24h</sub>) foram semelhantes entre si e a taxa obtida no grupo BCB<sub>-30h</sub> ( $p > 0,05$ ). Os oócitos do grupo BCB<sub>+</sub> maturados por 30h (BCB<sub>+30h</sub>) revelaram menores taxas de clivagem ( $p < 0,05$ ).

Com relação ao desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (D7), observou-se que o grupo de oócitos BCB+ maturados por 24h proporcionou número de blastocistos semelhante ao obtido com os oócitos do grupo controle ( $p>0,05$ ). Observamos ainda que, ambos os grupos de oócitos BCB- (24 e 30h de MIV), foram semelhantes entre si e ao grupos de oócitos BCB+<sub>30h</sub> ( $p>0,05$ ).

Tabela 1 – Taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos classificados de acordo com o teste de BCB e submetidos à MIV por 24 ou 30 horas

		COCs		Clivados		Blastocistos (D7)	
		N	N	%	N	%	
24h	Controle	152	107 <sup>a</sup>	70,4	27 <sup>ab</sup>	25,2	
	BCB+	226	165 <sup>a</sup>	73,0	53 <sup>a</sup>	32,1	
	BCB-	155	102 <sup>ab</sup>	65,8	21 <sup>bc</sup>	20,6	
30h	BCB+	208	124 <sup>b</sup>	59,6	20 <sup>bc</sup>	16,1	
	BCB-	143	92 <sup>ab</sup>	64,3	10 <sup>c</sup>	10,9	

Valores seguidos por mesma letra na mesma coluna não diferem pelo teste  $\chi^2$  ( $p>0,05$ ).

Ao manter o CIV das mórulas (D7) por mais 24h se observou um acréscimo de 71 blastocistos, sendo destes 13 a partir de oócitos do grupo controle; 21 a partir de oócitos BCB+; 9 a partir de BCB-, ambos maturados por 24h (BCB+<sub>24h</sub>, BCB-<sub>24h</sub>); 12 nos grupos BCB+ e 9 a partir de oócitos BCB- maturados por 30h (BCB+<sub>30h</sub>, BCB-<sub>30h</sub>). Este acréscimo representou uma média de 12% do total de blastocistos (controle - 12%; BCB+<sub>24h</sub> - 13%; BCB-<sub>24h</sub> - 9%; BCB+<sub>30h</sub> - 13% e BCB-<sub>30h</sub> - 13%) produzidos durante o CIV, não havendo diferenças entre os grupos ( $p>0,05$ ) (figura 1).

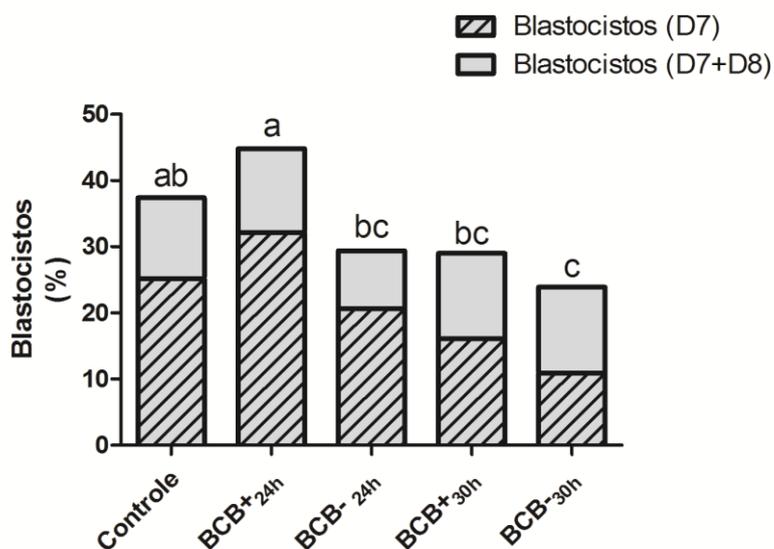


Figura 1 – Porcentagem de blastocistos ao sétimo e oitavo dia produzidos a partir de oócitos bovinos classificados pelo teste BCB e maturados *in vitro* por 24 ou 30 horas. Letras diferentes sobre as colunas diferiram pelo teste de  $\chi^2$  ( $p > 0,05$ ).

## Discussão

Entende-se por competência do oócito a capacidade deste em finalizar a meiose (prossequindo de vesícula germinativa até a fase de meiose II), ser fecundado, sofrer clivagem, suportar o desenvolvimento até blastocisto e proporcionar o nascimento de um indivíduo viável (SIRARD, 2006). Porém, não são todos os oócitos capazes de percorrer esta rota com sucesso, em especial quando derivados de ovários de fêmeas após o abate em frigoríficos (FERREIRA *et al.*, 2009).

Na prática, durante a seleção morfológica, usualmente realizada antes da MIV, algumas características são desejadas, por exemplo, a homogeneidade do citoplasma, a presença de um *Cumulus oophorus* compacto, com no mínimo três camadas homogêneas (BUKOWSKA *et al.* 2011) e maior que 110  $\mu\text{m}$  de diâmetro (FAIR *et al.*, 1995). No entanto, estas características são subjetivas e não podem prever com exatidão a competência dos gametas (AJDUK & ZERNICKA-GOETZ, 2013).

Técnicas de biologia molecular podem identificar com maior precisão os oócitos competentes à maturação, no entanto, esses procedimentos são usualmente invasivos ou letais, impossibilitando a utilização posterior dos gametas na PIV (MEIRELLES *et al.*, 2013).

O BCB teste tem se mostrado uma ferramenta adequada como técnica de identificação de oócitos competentes, previamente selecionados morfológicamente (BOLS *et al.*, 2012).

A observação de Silva *et al.* (2011) de que os oócitos BCB+ realizavam a maturação nuclear e citoplasmática síncrona, ao contrário do observado nos BCB-, foi a razão do emprego das 30h de MIV no experimento. Uma MIV mais longa poderia alterar a cascata de eventos metabólitos oocitários, sincronizando a maturação nuclear à citoplasmática dos BCB-.

Utilizando como controle os oócitos dos grupos BCB+ submetidos à MIV por 24 ou 30h, podemos observar que houve uma redução significativa da competência dos oócitos maturados por 30h, em suportar a fecundação e o desenvolvimento embrionário (tabela 1). Este efeito deletério pode ter tido como causa, o envelhecimento dos oócitos, o que, possivelmente, diminuiu a capacidade de fecundação (DONNAY *et al.*, 2004) e mais pronunciadamente a taxa de desenvolvimento embrionário inicial.

Porém, nossos resultados mostraram que o prolongamento do tempo de MIV não afetou (positiva ou negativamente) os oócitos BCB- (tabela 1), pois as taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionários até o estágio de blastocistos foram semelhantes (BCB-24h e BCB-30h) ( $p > 0,05$ ).

Tem sido amplamente demonstrado pela literatura que em bovinos o tempo de MIV ideal é 24h (SIRARD *et al.*, 1989; GILCHRIST & THOMPSON, 2007; WOUDEBERG *et al.*, 2012). Logo, o acréscimo de 6h foi determinante para diminuir a competência dos oócitos BCB+, o que, por outro, lado não afetou a competência dos BCB-.

Possivelmente os eventos nucleares ou a sincronidade da maturação nuclear e citoplasmática induzam processos que delimitam um prazo para a realização da fecundação e, conseqüentemente, o desenvolvimento embrionário. Para corroborar esta afirmação poderíamos empregar um método para atrasar temporariamente o procedimento da MIV, como a utilização de inibidores meióticos previamente à MIV (LAGUTINA *et al.*, 2002; LE BEUX *et al.*, 2003; CROCOMO *et al.*, 2013). Os inibidores meióticos previnem a retomada espontânea da meiose do oócito após ser retirado do ambiente folicular; em geral, pela inibição das quinases dependentes de ciclina e, conseqüentemente, evitando a formação do fator promotor de maturação (MPF) (GILCHRIST & THOMPSON, 2007). Logo, sua utilização atrasa a maturação

nuclear sendo possível manter este oócito viável por até 24h sem perda de sua competência (LAGUTINA *et al.*, 2002).

Silva *et al.* (2011) demonstraram que oócitos BCB+ são mais competentes em realizar a retomada da meiose (presença do primeiro corpúsculo polar), que oócitos BCB-; conseqüentemente, estes, teoricamente, poderiam ser mais susceptíveis ao prolongamento da MIV.

Observamos, porém, que apesar de não afetar negativamente os oócitos BCB-, a MIV prolongada não foi capaz de incrementar as taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário. Logo, outros fatores devem estar envolvidos neste processo, dentre eles o acúmulo prévio de RNAm e proteínas.

De acordo com Meirelles *et al.* (2013) e Krisher (2013), os oócitos acumulam, durante o crescimento, um largo estoque de RNAm e proteínas que são essenciais tanto para o próprio crescimento, bem como para maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário. Uma outra possibilidade para transpor esta barreira, poderia ser a realização da MIV em duas etapas (*two-step culture*); ou seja, um pré-cultivo utilizando um inibidor de meiose, seguido pela MIV, propriamente dita, como sugerida por Motlík *et al.* (2000).

Este procedimento foi utilizado com sucesso por Pavlok *et al.* (2000), onde, estes autores observaram um aumento da competência à MIV (capacidade de concluir a maturação nuclear até metáfase II) de oócitos bovinos recuperados de folículos pequenos (1 a 2 mm) utilizando 100 µm de Butirolactona I como inibidor meiótico. Porém, neste trabalho não foram realizadas todas as etapas da PIV, logo, não foi possível concluir sobre a eficiência da MIV em duas etapas (*two-step*).

Normalmente, a avaliação da qualidade embrionária é realizada morfológicamente (utilizando um esteromicroscópio com aumento de 50 ou 100x), sempre, levando-se em consideração o estágio de desenvolvimento e o tempo (BÓ & MAPLETOFT, 2013).

O desenvolvimento embrionário observado entre D7 e D8 foi semelhante entre os grupos experimentais, o que revela um potencial de desenvolvimento homogêneo, ou seja, ausência de alterações temporais no crescimento embrionário (figura 1).

Podemos concluir que a MIV por 30h não alterou a competência de oócitos com alta atividade da enzima G6PDH (BCB-), no entanto, reduziu a capacidade dos oócitos com baixa atividade enzimática (BCB+) em completar a MIV.

## Referências Bibliográficas

AJDUK, A.; ZERNICKA-GOETZ, M. Quality control of embryo development. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, p. 903-918, 2013.

ALCOBA, D.D.; BRAGA, B.L.R.; SANDI-MONROY, N.L.; PROENÇA, L.A.; LOPES, R.F.F.; OLIVEIRA, A.T.D. Selection of *Rattus norvegicus* oocytes for *in vitro* maturation by brilliant cresyl blue staining. **Zygote**, v. 21, n. 3, p. 238-245, 2011.

ALM, H.; TORNER, H.; LOHRKE, B.; VIERGUTZ, T.; GHONEIM, I.M.; KANITZ, W. Bovine blastocyst development rate *in vitro* is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue stainig before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Theriogenology**, v. 63, p. 2194-2205, 2005.

BÓ, G.A.; MAPLETOFT, R.J. Evaluation and classification of bovine embryos. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 344-348, 2013.

BOLS, P.E.J.; JORSSSEN, E.P.A., GOOVAERTS, I.G.F.; LANGBEEN, A.; LEROY, J.L.M.R. High throughput non-invasive oocyte quality assessment: the search continues. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 420-425, 2012

BUKOWSKA, D.; KEMPISTY, B.; PIOTROWSKA, H.; WALCZAK, R.; SNIADEK, P.; DZIUBAN, J.; BRUSSOW, K.P.; JASKOWSKI, J.M.; NOWICKI, M. The invasive and new non-invasive methods of mammalian oocyte and embryo quality assessment: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 57, n.4, p.169-176, 2011.

CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; RAMOS, A.A.; VALE FILHO, V.R. Factors influencing *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction**. V. 3, n. 1, p. 19-28, 2006.

CROCOMO, L.F.; MARQUES FILHO, W.C.; SUDANO, M.J.; PASCHOAL, D.M.; ALVARENGA, F.C.L.; BICUDO, S.D. Effect of roscovitine and cycloheximide on structure of sheep oocytes. **Small Ruminant Research**, v.109, p. 156-162, 2013.

DONNAY, I.; FAERGE, I.; GRONDAHL, C.; VERHAEGHE, B.; SAYOUD, H.; PONDERATO, N.; GALLI, G.; LAZZARI, G. Effect of prematuration, meiosis activating sterol and enriched maturation medium on the nuclear maturation and competence to development of calf oocytes. **Theriogenology**, v. 62, p. 1093-1107, 2004.

ERICSSON, S.A.; BOICE, M.L.; FUNAHASHI, H.; DAY, B.N. Assessment of porcine oocytes using brilliant cresyl blue. **Theriogenology**, v.39, p.214, 1993.

FAIR, T. Molecular and endocrine determinants of oocyte competence. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 277-282, 2013.

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

FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A.A.S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, N. 71, P. 836-48, 2009.

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

GUTNISKY, C.; DALVIT, G.C.; THOMPSON, J.G.; CETICA, P.D. Pentose phosphate pathway activity: effect on in vitro maturation and oxidative status of bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, <http://dx.doi.org/10.1071/RD12397>, 2013.

ISHIZAKI, C.; WATANABE, H.; BHUIYAN, M.M.U.; FUKUI, Y. Developmental competence of porcine oocytes selected by brilliant cresyl blue and matured individually in a chemically defined culture médium. **Theriogenology**, n. 72, p. 72-80, 2009.

KRISHER, R.L. In vivo and in vitro environmental effects on mammalian oocyte quality. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 1, p. 393-417, 2013.

LAGUTINA, I.; PONDERATO, N.; LAZZARI, G.; GALLI, C. Kinetics of oocyte maturation and subsequent development of IVF, parthenogenetic, and NT bovine embryos after meiotic inhibition with roscovitine. **Cloning and Stem Cells**, v.4, n.2, p.113-119, 2002.

LE BEUX, G.; RICHARD, F.J.; SIRARD, M. Effect od cycloheximide 6-DMAP, roscovitine and butyrolactone I on resumption of meiosis in porcine oocytes. **Theriogenology**, v.60, p.1049-1058, 2003.

LECHNIAK, D.; PERS-KAMCZYC, E.; PAWLAK, P. Timing of the first zygotic cleavage as a marker of developmental potential of mammalian embryos. **Reproductive Biology**, v. 8, n. 1, p. 23-42, 2008.

MEIRELLES, F.V.; CHIARATTI, M.R.; FERREIRA, R.M.; MEIRELLES, F.D.P.; BRESSAN, F.F. Strategies to increase in vitro embryo yield: Lesson from cell and molecular research. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 302-310, 2013.

MOTLÍK, J.; PAVLOK, A.; LAPATHITIS, G.; KUBELKA, M. Impact of two-step in vitro culture systems on developmental potency of oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 35, p. 267-271, 2000.

OPIELA, J.; KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L. The utility of brilliant cresyl blue (BCB) staining of mammalian oocytes used for in vitro embryo production (IVP). **Reproductive Biology**, n. 13, p. 177-183, 2013.

PAVLOK, A.; KANKA, J.; MOTLÍK, J.; VODICKA, P. Culture of bovine oocytes from small antral follicles in meiosis-inhibiting medium with butyrolactone I: RNA synthesis, nucleolar morphology and meiotic competence. **Animal Reproduction Science**, v. 64, p. 1-11, 2000.

PUJOL, M.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; PARAMIO, M.T. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. **Theriogenology**, n.61, p.735-744, 2004.

RODRIGUES, B.A.; RODRIGUEZ, P.; SILVA, A.E.F.; CAVALCANTE, L.F.; FELTRIN, C.; RODRIGUES, J.L. Preliminary study in immature canine oocytes stained with brilliant cresyl blue. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, supl.2, p.255-258, 2009.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, E.; LÓPEZ-BEJAR, M.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M.T. Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue and matured with cysteamine supplementation. **Reproduction, Nutrition and Development**, v.43, p.179-187, 2003.

SILVA, D.S.; RODRIGUEZ, P.; GALUPPO, A.; ARRUDA, N.S.; RODRIGUES, J.L. Selection of bovine oocytes by brilliant cresyl blue staining: effect on meiosis progression, organelle distribution and embryo development. **Zygote**, v.21, n.3, p.250-255, 2011.

SIRARD, M.A. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, p. 126-136, 2006.

SIRARD, M.A.; FLORMAN, M.L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; BARNES, F.L.; SIMS, M.L.; FIRST, N.L. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 40, p. 1257-1264, 1989.

VASSENA, R.; MAPLETOFT, R.J.; ALLODI, S.; SINGH, K.; ADAMS, G.P. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. **Theriogenology**, v. 60, p.923-932, 2003.

WANG, L.; LIN, J.; HUANG, J.; WANG, J.; ZHAO, Y.; CHEN, T. Selection of ovine oocytes by brilliant cresyl blue staining. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2012, p.1-7, 2012.

WOUDENBERG, A.B.; GRÖLLERS-MULDERIJ, M.; SNEL, C.; JEURISSEN, N.; STIERUM, R.; WOLTERBEEK, A. The bovine oocyte in vitro maturation model: A potential tool for reproductive toxicology screening. **Reproductive Toxicology**, n. 34, p. 251-260, 2012.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O teste BCB tem sido estudado em várias espécies animais seja com o objetivo de padronização, em especial para determinação da concentração ideal corante ou do tempo de exposição, ou ainda na determinação dos possíveis danos durante a aplicação, por exemplo estresse oxidativo e/ou estruturais na célula. Estes estudos, em geral, se preocupam em estudar os oócitos competentes (BCB+) deixando em segundo plano a reduzida competência dos oócitos BCB-.

No entanto, entendemos que uma proposta para aumentar a eficiência da PIV seria trabalhar na modificação ou adequação do procedimento desta biotécnica para incrementar as taxas de embriões de oócitos não competentes, ou seja, realizar um tratamento especial para os oócitos BCB-, seja em conjunto com BCB+ ou não.

Foi com este intuito que esta tese foi conduzida, e, alguns aspectos interessantes foram alcançados. Observamos em nossos trabalhos que a utilização do teste BCB como segundo método de classificação (seguido à avaliação morfológica) para submissão dos oócitos BCB+ e BCB- separadamente à MIV, pode aumentar a eficiência da PIV, além de que demonstramos que os oócitos BCB- podem ser maturados por um tempo prolongado sem redução da competência.

Estes resultados servem de base para novos estudos, dentre estes a possibilidade do cultivo *two-step* com utilização ou não bloqueadores meióticos e/ou fatores de indução da competência, como por exemplo o composto ITS, fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), fator de crescimento epidermal (EGF), proteína morfogenética óssea (BMP), dentre outros.

Outra proposta aparentemente viável seria submeter os oócitos BCB- a um ambiente semelhante ao encontrado no ambiente ovariano, posto que durante a fase de crescimento *in vivo*, o oócito é dependente do ambiente folicular e todas as suas relações endócrinas e parácrinas com os demais folículos (SIRARD, 2011).

A utilização do fluido folicular poderia ser uma possibilidade visto que recentemente, Somfai *et al.* (2012) ao utilizarem o fluido folicular ampliaram a expansão das células do *Cumulus* além de promover um maior acúmulo de ATP e redistribuição mitocondrial em oócitos bovinos submetidos à MIV, no entanto, neste trabalho os autores não realizaram a pré-seleção dos gametas através do teste BCB.

Mais estudos relacionando fatores pró- ou anti-apoptóticos e a determinação de um índice de apoptose que não comprometa a estrutura morfofuncional do oócito (ZEUNER *et al.*, 2003) devem ser realizados para o melhor entendimento da competência gamética ao procedimento de PIV.

No presente trabalho, pudemos observar que o teste BCB é uma ferramenta eficiente para inferir sobre atividade da enzima G6PDH e consequentemente identificar oócitos bovinos competentes para realização da PIV. Porém, mais estudos devem ser realizados para desenvolvimento de estratégias para indução da competência de oócitos com alta atividade da enzima G6PDH.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILLAR, J.J.; WOODS, G.L.; MIRAGAYA, M.H. Effect of homologous preovulatory follicular fluido on *in vitro* maturation on the development competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, n. 62, p. 1596-1606, 2004.

ALCOBA, D.D.; BRAGA, B.L.R.; SANDI-MONROY, N.L.; PROENÇA, L.A.; LOPES, R.F.F.; OLIVEIRA, A.T.D. Selection of *Rattus norvegicus* oocytes for *in vitro* maturation by brilliant cresyl blue staining. **Zygote**, v. 21, n. 3, p. 238-245, 2011.

ALM, H.; TORNER, H.; LOHRKE, B.; VIERGUTZ, T.; GHONEIM, I.M.; KANITZ, W. Bovine blastocyst development rate *in vitro* is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Theriogenology**, v. 63, p. 2194-2205, 2005.

ARLOTTO, T.; SCHWARTZ, J.L.; FIRST, N.L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L. Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p. 943-956, 1996.

BAVISTER, B.D.; SQUIRRELL, J.M. Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. **Human Reproduction**, v. 15, suppl. 2, p. 189-198, 2000.

BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; VAN DER HURK, R. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v. 47, p. 13-22, 1997.

BLANCO, M.R.; DEMYDA, S.; MORENO MILLÁN, M.; GENERO, E. Developmental competence of *in vivo* and *in vitro* matured oocytes: a review. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v.6, n.7, p.155-165, 2011.

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

BUKOWSKA, D.; KEMPISTY, B.; PIOTROWSKA, H.; WALCZAK, R.; SNIADEK, P.; DZIUBAN, J.; BRUSSOW, K.P.; JASKOWSKI, J.M.; NOWICKI, M. The invasive and new non-invasive methods of mammalian oocyte and embryo quality assessment: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 57, n.4, p.169-176, 2011.

CAGNONE, G.; SIRARD, M.A. The impact of exposure to serum lipids during *in vitro* culture on the transcriptome of bovine blastocysts. **Theriogenology**, v. 81, p. 712-722, 2014.

CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; RAMOS, A.A.; VALE FILHO, V.R. Factors influencing *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction**, V. 3, n. 1, p. 19-28, 2006.

CATALÁ, M.G.; IZQUIERDO, D.; UZBEKOVA, S.; MORATÓ, R.; ROURA, M.; ROMAGUERA, R.; PAPILLIER, P.; PARAMIO, M.T. Brilliant Cresyl Blue stain selects largest oocytes with highest mitochondrial activity, maturation-promoting factor

activity and embryo developmental competence in prepubertal sheep. **Reproduction**, v.142, n.4, p.517-527, 2011.

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

CHIAN, R.C. Maturation and developmental competence of immature oocytes retrieved from bovine ovaries at different phases of folliculogenesis. **Reproductive BioMedicine Online**. v. 4, n. 2, p. 127-132, 2002.

CÓRDOVA, B.; MORATÓ, R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, T.; MOGAS, T. Effect of the addition of insulin-transferrin-selenium and/or L-ascorbic acid to the *in vitro* maturation of prepubertal bovine oocytes on cytoplasmic maturation and embryo development. **Theriogenology**, v.74, p.1341-1348, 2010.

COSTA, N.N., CORDEIRO, M.S., SILVA, T.V.G., SATRE, D., SANTANA, P.P.B., SÁ, A.L.A., SAMPAIO, R.V., SANTOS, S.S.D., ADONA, P.R., MIRANDA, M.S., OHASHI, O.M. Effect of triiodothyronine on developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.80, n. 4, p. 295-301, 2013.

DAVACHI, N.D.; KOHRAM, H.; ZAINOALDINI, S. Cumulus cell layers as a critical factor in meiotic competence and cumulus expansion of ovine oocytes. **Small ruminant research**. V.102, p. 37-42, 2012.

DIAS, F.C.F.; DADARWAL, D.; ADAMS, G.P.; MRIGANK, H.; MAPLETOFT, R.J.; SINGH, J. Length of the follicular growing phase and oocyte competence in beef heifers. **Theriogenology**, v.79, p.1177-1183, 2013.

DONNAY, I.; VAN LONGENDONCKT, A.; AUQUIER, P.; MASSIP, A.; DESSY, F. A new phosphate-free medium for culture and co-culture of cattle embryos. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 18, p. 97, 1996.

ERICSSON, S.A.; BOICE, M.L.; FUNAHASHI, H.; DAY, B.N. Assessment of porcine oocytes using brilliant cresyl blue. **Theriogenology**, v.39, p.214, 1993.

FAIR, T. Molecular and endocrine determinants of oocyte competence. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 277-282, 2013.

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

FENG, W.G.; SUI, H.S.; HAN, Z.B.; CHANG, Z.L.; ZHOU, P.; LIU, D.J.; BAO, S.; TAN, J.H. Effects of follicular atresia and size on the developmental competence of bovine oocytes: A study using the well-in-drop culture system. **Theriogenology**, n. 67, p. 1339-1350, 2007.

FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A.A.S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, N. 71, P. 836-48, 2009.

FUJITA, J.; CRANE, A.M.; SOUZA, M.K.; DEJOSEZ, M.; KYBA, M.; FLAVELL, R.A.; THOMSON, J.A.; ZWAKA, T.P. Caspase, activity mediates the differentiation of embryonic stem cells. **Cell Stem Cell**, n.2, p.595-601, 2008.

FUKUDA, Y.; ICHIKAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y. Birth of normal calves resulting from bovine matured, fertilized and cultured with *Cumulus* cells in vitro up to the blastocyst stage. **Biology of Reproduction**, v. 42, p. 114-119, 1990.

GADELLA, B.M.; LUNA, C. Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. **Theriogenology**, v. 81, p. 74-84, 2014.

GOOVAERTS, I.G.F.; LEROY, J.L.M.R.; JORSSEN, E.P.A.; BOLS, P.E.J. Noninvasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte culture. **Theriogenology**, n.74, p.1509-1520, 2010.

GORDON, I. Maturing the bovine oocyte. *In: Laboratory production of cattle embryos*, CABI Publishing, p.112-157, 2003.

GUYADER-JOLY, C.; GUERIN, P.; RENARD, J.P.; GUILLAUD, J.; PONCHON, S.; MENEZO, Y. Precursors of taurine in female genital tract: effects on developmental capacity of bovine embryo produced in vitro. **Amino Acids**, v.15, p.27-42, 1998.

HAIJ, N.; HAAF, T. Epigenetic disturbances in in vitro cultured gametes and embryos: implications for human assisted reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 3, p. 633-641, 2013.

HENDRIKSEN, P.J.M.; VOS, P.L.A.M.; STEENWEG, W.N.M.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. **Theriogenology**, v.53, p.11-20, 2000.

HU, J.; MA, X.; BAO, J.C.; LI, W.; CHENG, D.; GAO, Z.; LEI, A.; YANG, C.; WANG, H. insulin-transferrin-selenium (ITS) improves maturation of porcine oocytes in vitro. **Zygote**, v.19, p.191-197, 2011.

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

ISHIZAKI, C.; WATANABE, H.; BHUIYAN, M.M.U.; FUKUI, Y. Developmental competence of porcine oocytes selected by brilliant cresyl blue and matured individually in a chemically defined culture medium. **Theriogenology**, n. 72, p. 72-80, 2009.

KELLY, J.; KLEEMANN, D.; RUDIGER, S.; WALKER, S. Effects of grade of oocyte-cumulus complex and the interactions between grades on the production of blastocysts in the cow, ewe and lamb. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, n.6, p.577-582, 2007.

KIM, M.; HONG, S.J.; LEE, J.H.; MIN, C.K.; HWANG, K.J.; PARK, R.W. Comparison of in vitro maturation media of immature oocytes: the effectiveness of blastocyst culture media. **Fertility and Sterility**, v.95, n.2, p.554-557, 2011.

LANE, M. Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress in vitro. **Theriogenology**, v. 55, p. 225-236, 2001.

LECHNIAK, D.; KACZMAREK, D.; STANISLAWSKI, D.; ADAMOWICZ, T. The polity of in vitro matured bovine oocytes is related to the diameter. **Theriogenology**, v. 57, p. 1303-1308, 2002.

LIU, M. The biology and dynamics of mammalian cortical granules. **Reproductive biology and Endocrinology**, v. 9, article 149, p. 1-17, 2011.

LIU, Z.; FOOTE, R.H. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O<sub>2</sub>. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 786-790, 1995.

LONERGAN, P.; FAIR, T. The ART of studying early embryo development: Progress and challenges in ruminant embryo culture. **Theriogenology**, v. 81, p. 49-55, 2014.

LOONERGAN, P., MONAGHAN, P., RIZOS, D., BOLAND, M.P., GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. **Molecular, Reproduction and Development**, n. 37, p. 58-53, 1994.

LUCAS, E. Epigenetic effects on the embryo as a result of periconceptional environment and assisted reproduction technology. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 27, p. 477-485, 2013.

MAO, L.; LOU, H.; LOU, Y.; WANG, N.; JIN, F. Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. **Reproductive BioMedicine Online**, *in press*, 2014.

MEIRELLES, F.V.; CHIARATTI, M.R.; FERREIRA, R.M.; MEIRELLES, F.D.P.; BRESSAN, F.F. Strategies to increase in vitro embryo yield: Lesson from cell and molecular research. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 302-310, 2013.

NABENISHI, H.; OHTA, H.; NISHIMOTO, T.; MORITA, T.; ASHIZAWA, K.; TSUZUKI, Y. The effects of cysteine addition during in vitro maturation on the developmental competence, ROS, GSH and apoptosis level of bovine oocytes exposed to heat stress. **Zygote**, v.20, p.249-259, 2011.

OKOISKI, A.; SIONIANA, D.; BANASINSKA, K. In-vitro maturation of equine oocytes in co-culture with granulosa and theca interna cells. **Equine Vet. J.**, v.25, p.84-86, 1993.

OPIELA, J.; KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L. The utility of brilliant cresyl blue (BCB) staining of mammalian oocytes used for in vitro embryo production (IVP). **Reproductive Biology**, n. 13, p. 177-183, 2013.

OPIELA, J.; RYNSKA, B.; KATSZA-KSIAZKIEWICZ, L. BCB test utility evaluated by caspase-3 activity in blastocysts developed from bovine oocytes with different G6PDH level. **Ann. Anim. Sci.**, v.10, n.1, p.27-38, 2010.

PARRISH, J.J. Bovine in vitro fertilization: In vitro maturation and sperm capacitation with heparin. **Theriogenology**, v. 81, p. 67-73, 2014.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARISH, J.L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; CRITSER, E.S.; EYESTONE, W.H.; FIRST, W.H. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v. 25, p. 591-600, 1986.

PERRY, G. 2012 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. **IETS Data Retrieval Committee**, 2013.

PONTES, J.H.F.; MELO STERZA, F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES, B.V.; RUBIN, K.C.P.; SENEDA, M.M. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 75, p. 1640-1646, 2011.

PUJOL, M.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; PARAMIO, M.T. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. **Theriogenology**, n.61, p.735-744, 2004.

RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. In vitro maturation of canine oocytes: a unique conundrum. **Animal Reproduction**, v.7, p.3-15, 2010.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, E.; LÓPEZ-BEJAR, M.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M.T. Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue and matured with cysteamine supplementation. **Reproduction, Nutrition and Development**, v.43, p.179-187, 2003.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, E.; LOPEZ-BEJAR, M.; VELILLA, E.; PARAMIO, M.T. Selection of prepubertal goat oocytes using the Brilliant Cresyl Blue test. **Theriogenology**, v.57, p.1397-409, 2002.

SCHEPPER, G.G.; VAN NOORDEN, C.J.F.; HOUTKOOPER, J.M. Age-related changes of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in mouse oocytes. **Histochemical Journal**, v.19, p.467-470, 1987.

SILVA, D.S.; RODRIGUEZ, P.; GALUPPO, A.; ARRUDA, N.S.; RODRIGUES, J.L. Selection of bovine oocytes by brilliant cresyl blue staining: effect on meiosis progression, organelle distribution and embryo development. **Zygote**, v.21, n.3, p.250-255, 2011.

SIRARD, M.A.; FLORMAN, M.L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; BARNES, F.L.; SIMS, M.L.; FIRST, N.L. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 40, p. 1257-1264, 1989.

SIRARD, M.A. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, p. 126-136, 2006.

SIRARD, M.A. Follicle environment and quality of in vitro matured oocytes. **J. Assist. Reprod. Genet.** v. 28, p.483-488, 2011.

SOMFAI, T.; INABA, Y.; WATANABE, S.; GESHI, M.; NAGAI, T. Follicular fluid supplementation during in vitro maturation promotes sperm penetration in bovine oocytes by enhancing cumulus expansion and increasing mitochondrial activity in oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v.24, n. 5, p. 743-752, 2012.

SUMMERS, M.C.; BIGGERS, J.D. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: Historical perspective and current issues. **Human Reproduction Update**, v. 9, n.6, p. 557-582, 2003.

SUTTON, M.L.; CETICA, P.D.; BECONI, M.T., KIND, K.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. **Reproduction**, v. 126, p. 27-34, 2003.

TAKAHASHI, Y.; FIRST, N.L. *In vitro* development of bovine embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. **Theriogenology**, v. 37, p. 963-978, 1992.

VANROOSE, G.; VAN SOOM, A.; KRUIF, A. From co-culture to defined medium: State of the art and practical considerations. **Reproduction in domestic animals**, v. 36, p. 25-28, 2001.

VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção in vitro de embriões bovinos: Estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 100-109, 2008.

VASSENA, R.; MAPLETOFT, R.J.; ALLODI, S.; SINGH, K.; ADAMS, G.P. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. **Theriogenology**, v. 60, p.923-932, 2003.

VIANA, J.H.M.; SIQUEIRA, L.G.B.; PALHÃO, M.P.; CAMARGO, L.S.A. Use of in vitro fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. Supl2, p. s661-s674, 2010.

VISCONTI, P.E.; WESTBROOK, V.A.; CHERTIHIN, O.; DEMARCO, I.; SLEIGHT, S.; DIEKMAN, A.B. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, p. 133-150, 2002.

WALLACE, M.; COTTEL, E.; GIBNEY, M.J.; MCAULIFFE, F.M. An investigation into the relationship between the metabolic profile of follicular fluid, oocyte developmental potential, and implantation outcome. **Assisted Reproduction**, v.97, n.5, p.1078-1084, 2012.

WANG, L.; LIN, J.; HUANG, J.; WANG, J.; ZHAO, Y.; CHEN, T. Selection of ovine oocytes by brilliant cresyl blue staining. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v.2012, p.1-7, 2012.

WARRIACH, H.M.; CHOCHAN, K.R. Thickness of cumulus cell layer is a significant factor in meiotic competence of buffalo oocytes. **Journal of Veterinary Science**, v.5, p.247-251, 2004.

WATSON, A.J., Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. **Journal of Animal Science**, v.85, p.E1–E3, 2006.

WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: Basic and applied aspects. **Animal Reproduction Science**, v. 60, n. 61, p. 535-547, 2000.

WOOD, T.C.; WILDT, D.D. Effect of the quality of the cumulus–oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.110, p.355–360, 1997.

YOUNG, L.E.; SINCLAIR, K.D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Reviews of Reproduction**, v. 3, p. 155-163, 1998.

## 7. ANEXOS

### 7.1. Fotomicrografias de complexos *Cumuli-oócitos* após o teste *BCB*

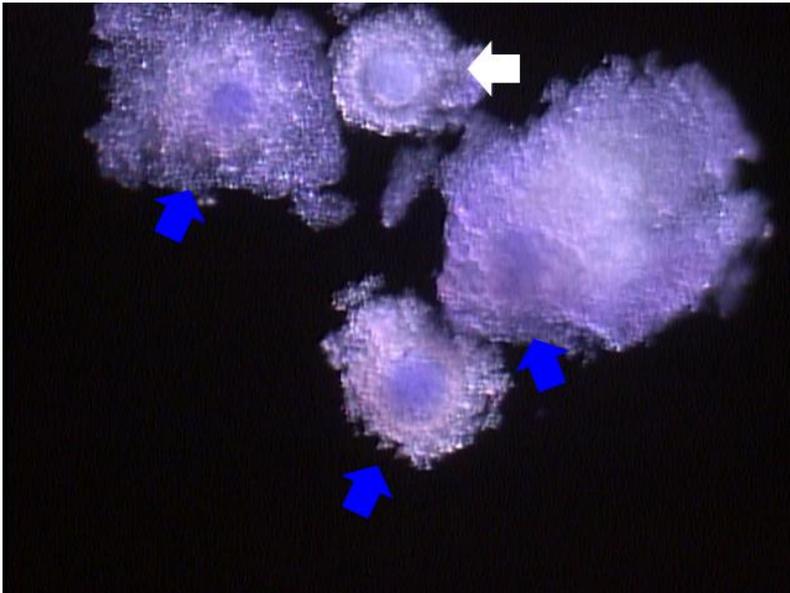


Figura 1 – Fotomicrografia de quatro complexos *Cumuli-oócitos*, sendo três classificados como BCB+ (setas azuis) e um BCB- (seta branca).

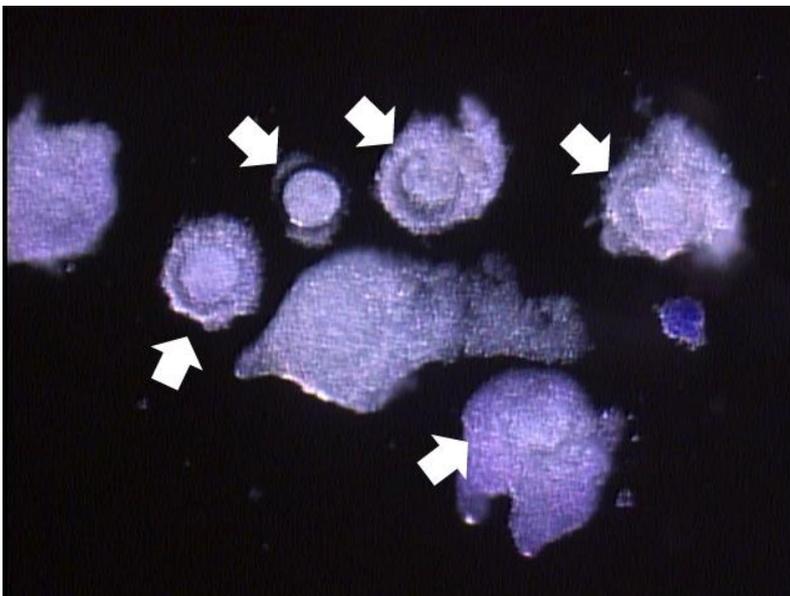


Figura 2 – Fotomicrografia de cinco complexos *Cumuli-oócitos* classificados como BCB- (setas brancas).

7.2. *Carta de seleção para participação do CBAB/CABBIO oferecido pelo Ministério de Ciência e Tecnologia em 2012*

## **Seleção curso 16 do CBAB**

---

De: **CBAB** (cbab@mct.gov.br) Você moveu esta mensagem para o local atual.  
 Enviada: quarta-feira, 12 de setembro de 2012 14:50:23  
 Para: rtagori@ifio.edu.br; lfaustino@gmail.com; mbsalviano@hotmail.com; ??aburba@uenf.br

Prezados Rafael, Luciana, Maurício e Angelo, bom dia.

Informo que vocês foram selecionados para participar do curso oferecido pelo CBAB "Biotecnología embrionaria: orientada al mejoramiento animal, conservación de recursos genéticos, desarrollo de fármacos y la producción de células madre embrionarias", a realizar-se entre os dias 15 e 26 de outubro, em Buenos Aires, Argentina.

Como é de seu conhecimento, sua passagem aérea será custeada pelo Governo Brasileiro e as diárias pelo Governo Argentino. Solicitamos confirmar sua participação, informando a cidade de origem de sua viagem a Buenos Aires, para que sejam emitidos seus bilhetes eletrônicos. O CBAB argentino fará as reservas de hotel em apartamentos duplos ou triplos. Assim que tivermos as informações, enviamos.

Para fins de prestação de contas junto ao CNPq, é imprescindível que após a viagem, os cartões de embarque utilizados para seu deslocamento sejam encaminhados ao seguinte endereço:

Vânia Gomes da Silva  
 Secretária Técnica do CBAB/CABBIO  
 Ministério da Ciência e Tecnologia  
 Secretaria de Política e Programas de Pesquisa e Desenvolvimento - SEPED  
 Coordenação Geral de Biotecnologia e Saúde - CGBS  
 Esplanada dos Ministérios, Bloco E, 2º andar, sala 256  
 CEP: 70067-900, Brasília, DF

Informamos ainda que essa prestação de contas é pré-requisito para o envio de seu certificado de participação.

Por fim, sugerimos que seja feito um seguro de viagem que proporcione assistência médica em caso de enfermidade ou acidente, cobertura de gastos com medicamentos e serviços odontológicos.

Atenciosamente,

--  
 Vânia Gomes da Silva, Mat. 1420508  
 Secretária Técnica do CBAB - Brasil

Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação  
 Secretaria de Política e Programas de Pesquisa e Desenvolvimento - SEPED  
 Coordenação Geral de Biotecnologia e Saúde - CGBS  
 Esplanada dos Ministérios, Bloco E, 2º andar, sala 256  
 CEP: 70067-900, Brasília, DF Telefone: (61) 2033-7623

### 7.3. Artigo publicado no periódico *Theriogenology* em 2013

Theriogenology 79 (2013) 1224–1228



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Theriogenology

journal homepage: [www.theriojournal.com](http://www.theriojournal.com)



#### Similar patterns of embryo development in canine oocytes cultured *in vitro* at oxygen tensions of 5 and 20%

B.A. Rodrigues\*, C.A. Rodrigues, M.B. Salviano, B.R. Willhelm, F.J.F. Collares, J.L. Rodrigues

Laboratory of Embryology and Biotechniques of Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

7.4. *Artigo publicado no periódico BMC Evolutionary Biology em 2014*

Cursino et al. *BMC Evolutionary Biology* 2014, **14**:40  
<http://www.biomedcentral.com/1471-2148/14/40>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

## The role of chromosome variation in the speciation of the red brocket deer complex: the study of reproductive isolation in females

Marina Suzuki Cursino<sup>1,2\*</sup>, Maurício Barbosa Salviano<sup>3</sup>, Vanessa Veltrini Abril<sup>1</sup>, Eveline dos Santos Zanetti<sup>1</sup> and José Maurício Barbanti Duarte<sup>1,2</sup>

## 7.5. *Resumo apresentado no Simpósio da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) 2013*

282 *Reproduction, Fertility and Development*

Oocyte Maturation

### 270 HIGH GASEOUS PRESSURE PRETREATMENT IN *IN VITRO* MATURATION OF CANINE OOCYTES

B. A. Rodrigues, C. A. Rodrigues, M. B. Salviano, B. R. Wilhelm, F. J. F. Collares, and J. L. Rodrigues

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Stress processes, such as hydrostatic pressure treatment of oocytes in different species, have been reported to increased embryo rate following *in vitro* maturation (IVM). However, studies on high gaseous pressure (HGP) pretreatment in IVM of oocytes from domestic animals are lacking in the

literature. This experiment aimed to test HGP pretreatment of canine oocytes to increase meiosis achievement (metaphase II) after IVM. A total of 502 canine oocytes (6 replicates) were used in this study. Ovaries from 15 bitches were obtained from local shelters or rescue organizations after ovariectomy. Sample collection was blind as to reproductive stage and dog age. The ovaries were transported to the laboratory in 0.9% NaCl and were processed within 3 h of collection. The ovarian cortex was sliced and washed in PBS with 1% FCS to release cumulus-oocyte complexes. Grade 1 and 2 cumulus-oocyte complexes were selected for IVM and randomly distributed into 3 treatment groups: HGP (oocytes placed in PBS and subjected to pressure chamber; 206 oocytes), ambient control (oocytes maintained in TCM-HEPES at room temperature for 60 min; 130 oocytes), and laboratory protocol (oocytes IVM after morphologic selection; 166 oocytes). The average pressure, initial and final temperature, and duration of oocytes in the HGP pretreatment were 76.19 atm ( $\pm 0.92$ ), 32.20°C ( $\pm 5.17$ ) and 27.71°C ( $\pm 3.17$ ), and 60 min, respectively. *In vitro* maturation was carried out for 72 h at 37°C in a high-glucose medium, consisting of TCM-199 with 2.2 mg mL<sup>-1</sup> of sodium bicarbonate (11150, Gibco, Grand Island, NY, USA), and supplemented with 0.1% polyvinyl alcohol (P-8136, Sigma, St. Louis, MO, USA), 0.991 mg mL<sup>-1</sup> of glucose (108337, Merck, Darmstadt, Germany), 50 µg mL<sup>-1</sup> of gentamicin, 22 µg mL<sup>-1</sup> of pyruvic acid, 20 µg mL<sup>-1</sup> of oestradiol (E-8875, Sigma), 0.5 µg mL<sup>-1</sup> of FSH (Folltropin-V, Vetapharm Inca), 0.03 IU mL<sup>-1</sup> of hCG (Chorulon®, Intervet, Kenilworth, NJ, USA), under 20% oxygen tension. The number of oocytes at each stage (prophase to metaphase II) was recorded according to the morphology of nuclear content after staining with Hoechst 33342. For comparison purposes of nuclear maturation in oocytes, data were analysed by Fisher's exact test. Differences at a *P*-value  $\leq 0.05$  were considered significant. Oocytes from the HGP, ambient control, and laboratory protocol groups had similar meiotic progression to the metaphase II stage (metaphase I-anaphase I-telophase I-metaphase II), and were 35.4% (73/206), 30.8% (40/130), and 34.9% (58/166), respectively (*P*  $\geq 0.05$ ). The proportion of oocytes without chromatin or having an irregular organisation was not different among groups. In conclusion, results indicate that HGP pretreatment as used in this experiment did not improve meiosis rates in IVM canine oocytes. Further investigations to understand the significance of HGP pretreatment in IVM and *in vitro* production of canine embryos are ongoing in our laboratory.