

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

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS UTILIZANDO
DIFERENTES CONDIÇÕES DE MATURAÇÃO OOCITÁRIA**

CLAUDIA BRIANI ANTONIOLLI

Porto Alegre

2005

FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIAS

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS UTILIZANDO
DIFERENTES CONDIÇÕES DE MATURAÇÃO**

AUTORA: CLAUDIA BRIANI ANTONIOLLI

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de concentração em Biotécnicas da Reprodução Animal, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (RS).

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Rodrigues

PORTO ALEGRE, agosto 2005



FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

APROVADO POR:

**Prof. Dra. ADRIANA BOS MIKICH,
Membro da Banca.**

**Prof. Dra. MARA IOLANDA BATISTELLA RUBIN,
Membro da Banca.**

**Prof. Dr. ALCEU MEZZALIRA,
Membro da Banca.**

Muitos perdem a vida tentando ganha-lá. Viva.

AGRADECIMENTOS

Especialmente a minha avó amada Nilce Briani pelo carinho desmedido, aos meus pais Almor e Ana Gilda e minha irmã Paula pela paciência, investimento, amor incondicional e mesmo distantes fisicamente estiveram sempre presentes em meus pensamentos e sem esquecer do mais novo membro da família meu cunhado André.

Ao meu orientador Professor Doutor José Luiz Rodrigues pela amizade, compreensão, paciência, confiança e principalmente pela oportunidade única de crescimento profissional e pessoal.

Aos meus amigos do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução que ao longo do tempo tornaram-se uma família e para sempre estarão em meu coração.

Ao Programa de Pós Graduação e a Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade e o ensino de extrema qualidade.

Aos meus amigos pratenses que mesmo estando na capital me fazem sentir no interior, em casa. E aos amigos que estão em Nova Prata e me acolhem nos finais de semana com tanto carinho. Ao meu segundo pai tio Lauri, tia Bete, dinda Lézia, Lú minha segunda mãe, e a todos da minha família querida.

Em especial ao amigo Aino Jaques pelo apoio e conselhos.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
SUMÁRIO	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
1. INTRODUÇÃO	8
2. ARTIGO.....	14
2.1. RESUMO	14
2.2. ABSTRACT	15
2.3. INTRODUÇÃO	16
2.4. MATERIAL E MÉTODOS	17
2.5. RESULTADOS.....	21
2.6. DISCUSSÃO	23
2.7. CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS	27

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Taxa de clivagem de oócitos bovinos maturados em TCM-199 na presença de diferentes fontes protéicas e suplementação hormonal..... 21
- Tabela 2: Taxa de desenvolvimento embrionário, a partir de oócitos maturados em TCM-199 na presença de diferentes fontes protéicas e suplementação hormonal. 22

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
μL	Microlitro (s)
BSA	Albumina Sérica Bovina
CCO(s)	Complexo <i>cumulus</i> -oócito (s)
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
E 17β	Estradiol
FF	Fluído Folicular
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
h	Hora (s)
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
LH	Hormônio Luteinizante
μg	Miligramma (s)
MII	Metáfase II
Min.	Minuto
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
μL	Mililitro (s)
mM	Mili-molar
PBS	Solução Salina Fosfatada
PIV	Produção <i>In Vitro</i>
PVA	Álcool Polivinílico
PVP	Polivinil-Pirolidona
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAm	Ácido Ribonucléico Mensageiro
SEE	Soro de Égua em Estro
SFB	Soro Fetal Bovino

SOF	Fluído Sintético de Oviduto
SVE	Soro de Vaca em Estro
TALP	Tirode-albumina-lactato-piruvato
TCM-199	Meio de Cultivo de Tecidos199
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UI	Unidade Internacional
v/v	Volume/Volume
VG	Vesícula Germinal
VGBD	Quebra da Vesícula Germinal

1. INTRODUÇÃO

A compreensão do processo de maturação *in vivo* dos oócitos bovinos é de importância para possibilitar a identificação de um ambiente artificial próximo do fisiológico, o folículo ovariano. Já se passaram mais de 20 anos desde o nascimento do primeiro terneiro oriundo da maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos (Brackett *et al.*, 1982) e até hoje os aspectos moleculares e estruturais da maturação dos oócitos não foram totalmente esclarecidos.

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

Nos protocolos usuais de produção *in vitro* de embriões bovinos (PIV) os oócitos são obtidos de folículos antrais através de processos como a aspiração folicular e a escarificação da córtex ovariana. Os folículos contêm oócitos imaturos que se encontram estacionados na prófase I da meiose, ou seja, em vesícula germinal (VG). Estes oócitos se mantêm estagnados dentro do folículo devido a fatores inibitórios do mesmo (Sirard, 2001).

A maturação oocitária envolve dois eventos celulares, os nucleares e os citoplasmáticos. De acordo com Bevers *et al.* (1997); van den Hurk e Zhao (2005) na maturação nuclear ocorre a retomada da meiose da VG, com a ruptura do envelope nuclear (VGBD) e a meiose prossegue até o estágio de metáfase II, onde novamente fica estacionada até o momento da fecundação. Paralelamente à maturação nuclear, ocorre a maturação citoplasmática onde as alterações moleculares e estruturais acontecem de maneira que o oócito tenha capacidade para suportar a fecundação e o desenvolvimento embrionário. Os eventos envolvidos na maturação citoplasmática incluem a transcrição de RNAm, síntese protéica, modificações estruturais das proteínas, alterações na ultraestrutura e organização dos grânulos corticais (van den Hurk e Zhao, 2005). Ao contrário dos eventos

que ocorrem na maturação nuclear que podem ser facilmente mensurados em laboratório através de técnicas de coloração, a avaliação da maturação citoplasmática exige técnicas mais apuradas como análise de RNA e microscopia eletrônica. Segundo Krisher (2004) uma alternativa para avaliação da maturação citoplasmática é o sucesso da fecundação, desenvolvimento embrionário e fetal.

A MIV é afetada por diversos fatores como temperatura e tempo gasto para o transporte dos ovários do abatedouro até o laboratório (Yang *et al.*, 1990), tamanho dos folículos (Blondin e Sirard, 1995; Pavlok *et al.*, 1992), estágios de desenvolvimento dos oócitos (Hagemann *et al.*, 1999), diâmetro do oócito (Hyttel *et al.*, 1997), composição do meio (Lonergan *et al.*, 1997), hormônios (Zuelke e Brackett, 1990) e soro (Avery *et al.*, 1998).

No que diz respeito aos meios utilizados para MIV, Takagi *et al.* (1998) sugerem que o meio de maturação tenha características similares à composição do fluido folicular (FF). O FF já foi utilizado na MIV de oócitos bovinos, proporcionando uma maior expansão das células do *cumulus*. Por outro lado houve uma maior incidência de inibição meiótica, fenômeno não observado quando oócitos foram maturados em meio comercial.

Ainda relacionado aos meios utilizados para a MIV, Gordon (2003) sugere que podem ser classificados em simples e complexos. Os meios simples contêm sais básicos, piruvato, lactato, glicose e são usualmente tamponados com bicarbonato de sódio. Os meios complexos possuem os mesmos componentes dos meios simples, mas são suplementados com aminoácidos, vitaminas, purinas e outros componentes. De acordo com Marquant-Leguienne e Humblot (1998), os meios complexos são os mais utilizados para MIV, principalmente o meio de cultura de tecidos 199 e o meio Ham's F10. Os meios complexos podem ser suplementados com diferentes fontes protéicas, hormônios (FSH/LH, estradiol-E 17 β), bem como outras substâncias, como por exemplo, os fatores de crescimento.

Os meios podem também ser classificados como definidos ou indefinidos. Segundo Thompson (1996), o sistema de cultivo embrionário definido é aquele no qual o meio e o ambiente físico possuem componentes identificáveis antes do cultivo embrionário. Para o autor os sistemas que utilizam BSA livres de ácidos graxos são aceitáveis como definidos. Outros autores como Krisher *et al.* (1999), utilizam o termo semi-definido para sistemas

que incluem BSA, sendo todos os meios que utilizam soro na composição, denominados indefinidos.

Gordon (2003), cita que o soro é frequentemente utilizado nos sistemas de maturação e contém uma grande variedade de componentes incluindo, hormônios, fatores de crescimento, aminoácidos e proteínas. Estas substâncias de uma maneira geral são benéficas ao sistema de maturação, mas em contra partida dificultam a repetibilidade de resultados em diferentes laboratórios (Bavister, 1995). Além disso, o soro pode ser uma fonte potencial de contaminação viral do sistema de PIV (Stringfellow *et al.*, 2004).

Várias fontes de soro vem sendo empregadas na produção *in vitro* de embriões tais como soro de vaca em estro (Wrenzycki *et al.*, 2001), soro fetal bovino (Leibfried-Rutledge *et al.*, 1986; Pinyopumintr e Bavister, 1994) e soro de égua em estro (SEE) (Figueiró *et al.*, 2002). O soro de vaca em estro (SVE) tem uma concentração maior de hormônios (esteróides e gonadotrofinas) o que o difere de soros coletados em outras fases do ciclo estral ou de outras categorias de animais. Estas diferenças de concentrações hormonais interferem na efetividade do SVE como suplemento para o meio de MIV muitas vezes mais marcante do que as observadas em outros tipos de soro (Gordon, 2003). Usualmente o soro de vaca em estro é obtido e processado no próprio laboratório, o que pode induzir uma maior variabilidade entre lotes, dificultando a repetibilidade de resultados entre laboratórios além de apresentar o risco de conter agentes contaminantes (Stringfellow *et al.*, 2004).

Outra fonte protéica adicionada com freqüência nos meios é o soro fetal bovino (SFB) que contém diferentes substâncias que interferem na maturação oocitária e no desenvolvimento embrionário tais como fatores de crescimento, lipídeos, albumina, hormônios, esteróides, colesterol e peptídeos (Keskintepe *et al.*, 1995). Uma vantagem da utilização do SFB, é que este pode ser facilmente adquirido de laboratórios comerciais, diminuindo relativamente a variabilidade e o risco de contaminação viral, uma vez que estes laboratórios testam o soro contra uma série de agentes patogênicos.

Uma estratégia para tentar diminuir o risco sanitário da utilização de soro, é a utilização de soro equino. Figueiró *et al.* (2002) utilizaram o soro de égua de diferentes fases do estro e SVE na produção *in vitro* de embriões bovinos e obtiveram resultados superiores de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto com o SEE. Os

autores atribuíram estes resultados aos fatores inespecíficos presentes no SEE. Kamiska *et al.* (1990) descreveram maiores concentrações de poliaminas, em função da menor atividade de poliamina oxidase no soro equino.

Apesar da BSA ser uma proteína purificada industrialmente por laboratórios comerciais, Gordon (2003) considera a BSA como um componente variável do meio de maturação, por potencialmente carrear componentes de baixo peso molecular, o que determina uma variação entre os lotes produzidos.

Para contornar estas barreiras técnicas e para estabelecer um meio padrão definido, os componentes indefinidos deveriam ser substituídos por macromoléculas sintéticas, como o álcool polivinílico (PVA) (Pinyopummintr e Bavister, 1991; Eckert e Niemann, 1995). PVA e polivinil pirrolidona (PVP) são comumente utilizados como alternativas não biológicas para a substituição de suplementações protéicas, como auxiliar na manipulação de oócitos e embriões. Embora oócitos maturados em meio suplementado com PVA ou PVP proporcionem baixas taxas de fecundação poliespermática, o desenvolvimento até o estágio de blastocisto é comprometido quando comparado com o desenvolvimento de oócitos maturados na presença de proteínas (Eckert e Niemann, 1995; Fukui *et al.*, 2000).

Ali e Sirard (2002) relataram na espécie bovina, que a suplementação protéica durante a MIV pode modificar as taxas de desenvolvimento embrionário até os estádios de mórula e blastocisto. Os autores obtiveram maturação de oócitos em meio sem suplementação protéica, adicionado de macromolécula sintética (PVP-40). Este sistema proporciona um ambiente favorável para a realização de experimentos em condições definidas durante a MIV.

Ali e Sirard (2002) e Saeki *et al.* (1991) examinaram o efeito do PVP na maturação de oócitos bovinos e no subsequente desenvolvimento embrionário *in vitro*. Estes autores descreveram que a presença de PVP durante a maturação, na ausência de hormônios (FSH, LH e estradiol), proporcionou o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto. Em outros experimentos Lonergan *et al.* (1992) e Monaghan *et al.* (1993) relataram, entretanto, que o efeito benéfico de PVP durante a MIV foi refletido no desenvolvimento de mórulas e blastocistos, obtidos na presença de várias concentrações de gonadotrofinas e/ou células da granulosa.

Além das divergências existentes em relação à suplementação dos meios de MIV outra questão ainda em aberto é a necessidade da adição de hormônios aos mesmos e sua interação com os suplementos, gerando efeitos sobre o desenvolvimento embrionário. Choi *et al.* (2001) procuraram determinar as concentrações ideais de gonadotrofina relativamente pura, para serem adicionadas ao meio semi-definido para a MIV de oócitos bovinos. Os autores observaram que a adição de FSH e LH ao meio de maturação não incrementou as taxas de desenvolvimento embrionário quando o meio não continha soro. Estas observações indicam que substâncias presentes no soro, como, por exemplo, hormônio ou fatores de crescimento devem ser necessários ao metabolismo das células embrionárias. Sabe-se que a suplementação hormonal é necessária para ativação dos mecanismos de maturação dos oócitos, tanto nucleares como citoplasmáticos, assim como para a fecundação *in vitro* e para o posterior desenvolvimento embrionário (Sanbuissho e Threlfall, 1990; Brackett e Zuelke, 1993). Segundo, Peña *et al.* (2002), oócitos expostos a gonadotrofinas têm maior competência em proporcionar o desenvolvimento embrionário. A adição de FSH e hCG ao meio de maturação significou um aumento da frequência de formação de pró-núcleos quando comparado ao meio sem adição de gonadotrofinas. Ambos, SVE e SFB quando utilizados como suplementação protéica no meio de MIV promoveram maturação oocitária. No entanto, de acordo com as observações de Sanbuissho e Threlfall (1990), a adição da combinação de FSH+hCG ao meio não alterou as taxas de MIV dos oócitos, mas por outro lado contribuiu para uma maior formação de pró-núcleos.

O objetivo deste experimento foi determinar as taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro* a partir de oócitos bovinos maturados em meio TCM-199 indefinido (suplementado com SVE, SEE e SFB), meio semi-definido (suplementado com BSA), ou definido (suplementado com PVP), na presença ou ausência de suplementação hormonal de FSH e hCG, nas condições do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da UFRGS.

2. ARTIGO

Produção *in vitro* de embriões bovinos utilizando diferentes condições de maturação oocitária

RESUMO

O experimento avaliou o uso do meio TCM-199 suplementado com: SVE, SEE e SFB (meio indefinido); BSA (meio semi-definido) e PVA (meio definido); na presença ou ausência de hormônios (FSH e hCG) na maturação *in vitro* de oócitos bovinos nas condições do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da UFRGS. Complexos *cumuli-oophorus* (CCOs), em número total de 1458, foram aleatoriamente distribuídos em doze tratamentos, maturados por 24 h em atmosfera de 5% CO₂, em ar e 100% umidade relativa em estufa a 39°C. A fecundação nos doze tratamentos foi realizada mediante exposição dos CCOs maturados aos espermatozoides (1x10⁶/mL), previamente capacitados, durante 20 h. O cultivo foi realizado em fluido sintético de oviduto modificado (SOFaa) acrescido de 10% SVE a 39°C, 100% de umidade relativa do ar e 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂. Na presença de hormônios os meios indefinidos (SVE: 63,6%, 70/110; SEE: 53,4%, 70/131 e SFB: 56,0%, 75/134) apresentaram maior eficiência em proporcionar suporte à primeira divisão embrionária, em comparação ao meio definido (PVP: 50,6%, 45/89). Os CCOs maturados em meio indefinido suplementado com SVE e hormônios apresentaram maior competência em fecundar e suportar o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto após sete dias de cultivo (27,3%, 30/110).

Palavras chave: Embriões. Bovinos. PIV. Maturação *in vitro*. Meio.

ABSTRACT

The present experiment evaluated the use of TCM-199 medium as non-defined media (supplemented with SVE, SEE and SFB), semi defined media (supplemented with BSA) and defined media (supplemented with PVP) on bovine oocytes maturation in vitro, with or without hormonal supplementation (FSH + hCG) on the conditions of the Laboratory of Embriology and Biotecnics of Reproduction of the Federal University of Rio Grande do Sul. A total of 1458 cumuli oophorus complex (COCs), were randomly divided in twelve treatments, matured for 24 hours in one incubator at 39°C, 100% relative humidity and 5% CO₂ atmosphere. The fertilization in the twelve treatments was carried out by the exposure of the matured COCs to spermatozoa (1×10^6), previously capacited. Embryos were cultured in modified synthetic oviduct fluid medium (SOFaa) supplemented with 10% SVE at 39°C, 100% relative humidity and 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂. In the presence of hormones, the defined (PVP: 50,6%, 45/89) and non-defined (SVE: 63,6%, 70/110; SEE: 53,4%, 70/131 e SFB: 56,0%, 75/134) medium showed significantly rates of first embryo cleavage. The COCs matured non-defined media supplemented with SVE and hormones showed the best rates of fertilization and blastoyst development (27,3 %, 30/110) to undergo fertilization and develop to blastocyst stage after seven days of in vitro culture.

Keywords: in vitro maturation, embryo, bovine, medium, PIV.

2.3. INTRODUÇÃO

De acordo com Lonergan *et al.* (2003), 90% dos *cumuli-oophorus* submetidos ao processo de produção *in vitro* de embriões bovinos (PIV), realizam maturação nuclear, 80% são fecundados, clivam e chegam ao estágio de duas células. Entretanto, as taxas de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto são reduzidas a aproximadamente 40%. Os mesmos autores sugerem que a qualidade intrínseca dos oócitos submetidos ao sistema de PIV é o fator chave que irá determinar o número destes oócitos que terá capacidade para ser fecundado e permitir o desenvolvimento até o estágio de blastocisto.

As fontes protéicas contêm componentes indefinidos e apresentam grande variabilidade de um lote para outro, dificultando assim a repetibilidade de resultados entre laboratórios que produzem embriões bovinos *in vitro*. Além disso, fontes protéicas apresentam o risco de serem carreadoras de agentes virais (Stringfellow *et al.*, 2004).

A fim de minimizar estas desvantagens uma alternativa seria a utilização de meio livre de suplementação com soro (meio quimicamente definido). Gandhi *et al.* (2000) descreveram que oócitos maturados, fecundados e cultivados *in vitro* em meio definido podem atingir o estágio de blastocisto.

Park *et al.* (2005) destacam que mesmo com o progresso alcançado na produção de embriões bovinos *in vitro*, a eficiência da maturação oocitária e do desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, ainda é a mesma descrita por Lonergan *et al.* (2003). O objetivo deste estudo que foi determinar as taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro* a partir de oócitos bovinos maturados em meio TCM-199 suplementado com SVE, SEE e SFB (meio indefinido), suplementado com BSA (meio semi-definido), suplementado com PVP (meio definido), na presença ou ausência de suplementação hormonal de FSH e hCG, nas condições do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da UFRGS.

2.4. MATERIAL E MÉTODOS

Maturação *in vitro*

Foram utilizados, para os experimentos, ovários de vacas provenientes de abatedouros localizados nas cidades de Sapiranga e São Leopoldo no estado do Rio Grande do Sul. Os ovários colhidos imediatamente após o abate das fêmeas foram transportados até o laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da UFRGS em recipiente térmico a 30 °C contendo PBSm (Whittingham, 1971). Através da escarificação da córtex ovariana em solução de PBS modificado suplementada com 2300 UI de heparina (Sigma, H-0777), obteve-se os complexos *cumuli*-oócitos (CCOs). O meio contendo os oócitos foi tamisado para um copo de Becker e após 20 minutos o sobrenadante foi retirado por sifonagem. O sedimento foi transferido para placas de Petri de 90 mm (Pleion-C-10) onde foi realizada a procura dos CCOs, sob estereomicroscópio (15X). Os CCOs foram transferidos para placas de Petri de 35mm (Greiner, 627160) contendo TCM modificado composto por TCM-199 (Sigma, M-2520) acrescido de 4.2 mM de NaHCO₃ (Sigma, S-5761), 50 mg/mL sulfato de gentamicina (Sigma, G-1264), 14,3 mM Hepes (Sigma, H-3375), onde foram selecionados.

Os complexos *cumuli* oócitos compactos (1.458) com citoplasma homogêneo foram selecionados e distribuídos aleatoriamente em doze diferentes tratamentos:

T1	TCM-199	SVE*	FSH/hCG (+)
T2	TCM-199	SVE*	FSH/hCG (-)
T3	TCM-199	SEE*	FSH/hCG (+)
T4	TCM-199	SEE*	FSH/hCG (-)
T5	TCM-199	SFB*	FSH /hCG(+)
T6	TCM-199	SFB*	FSH /hCG(-)
T7	TCM-199	BSA**	FSH /hCG(+)
T8	TCM-199	BSA**	FSH /hCG(-)
T9	TCM-199	PVP***	FSH /hCG(+)
T10	TCM-199	PVP***	FSH /hCG(-)
T11	TCM-199	NENHUMA	FSH /hCG(+)
T12	TCM-199	NENHUMA	FSH /hCG(-)

As suplementações ao meio TCM-199 foram adicionadas nas seguintes concentrações: *10% de SVE, SEE e SFB; **4 mg/mL de BSA; ***8 mg/mL de PVP; (+) 0,05 mg/mL de FSH (Vetpharm, Folltropin-V) + 0,03 U.I. mg/mL de hCG (Organon, Pregnil). Os CCOs foram maturados nos tratamentos em grupos de 15, em gotas de 100 µL, onde foram maturados em meio TCM-199 acrescido de 50 mg/mL gentamicina, 0,2 mM piruvato de sódio (Merck, 6619), 26 mM NaHCO₃ em estufa de cultivo a 39°C, com 100% de umidade relativa do ar, durante 24h em placas de 35 mm sob óleo mineral (Sigma, M-8410). Neste experimento, foram maturados em média de 120 oócitos por tratamento em três replicações.

Fecundação *in vitro*

Para a fecundação foram utilizadas palhetas de 0,5 mL de sêmen congelado de um único touro. Os espermatozoides foram separados pelo método *swim up* que consiste na deposição no fundo de um tubo cônico previamente aquecido, preenchido com 1 mL de “Sperm-TALP” (Parrish *et al.*, 1985) composto por 100 mM NaCl (Sigma, S-5886), 3,1 mM KCL (Sigma, P-5405), 2,9 mM NaH₂PO₄ (Sigma, S-5011), 2,0 mM CaCl₂ (Sigma, C-7902) 0,4 mM MgCl₂ (Sigma, M-2393), 50 µg/mL de gentamicina (Sigma, G-1264), 16,9

mM lactato de sódio (Sigma, L-4263), 10 mM Hepes (Sigma, H-3375), 25 mM NaHCO₃ (Sigma, S-5761), 10 µg/mL vermelho de fenol (Sigma, P-5530), 1 mM piruvato de sódio (Merck, 6619), 6 mg/mL BSA (Gibco, 11018-017) onde permaneceram por 1 hora em estufa. Os espermatozóides viáveis migraram para a superfície e 850 µL do sobrenadante foram retirados. O conteúdo foi centrifugado por 5 minutos a 500 x g e formou um *pellet* que foi ressuspensão no meio de fecundação “Fert-TALP” (Parrish *et al.*, 1985) composto por 113,9 mM NaCl (Sigma, S-5886), 3,2 mM KCl (Sigma, P-5405), 2,9 mM NaH₂PO₄ (Sigma, S-5011), 2,0 mM CaCl₂ (Sigma, C-7902), 0,78 mM MgCl₂ (Sigma M-2393), 50 µg/mL gentamicina (Sigma, G-1264), 7,6 mM lactato de sódio (Sigma, L-4263), 25 mM NaHCO₃ (Sigma, S-5761), 10 µg/mL vermelho de fenol (Sigma, P-5530), 0,25 mM piruvato de sódio (Merck, 6619), 6 mg/mL BSA (Gibco, 11018-017) suplementado com 3 µg/mL de penicilamina (Sigma, P-5125), 5,6 µg/mL de heparina (Sigma, H-3149), 1,1 µg/mL hipotaurina (Sigma, H-1384), 0,18 µg/mL epinefrina (Sigma, E-4250). Os CCOs foram lavados três vezes neste meio e transferidos para as gotas de fecundação (15 CCOs/gota de 100 µL), em placas de 35 mm, sob óleo mineral, onde foram inseminados com 100.000 espermatozóides. Após permaneceram durante 18 a 20 horas a 39°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar e 100% de umidade relativa.

Cultivo *in vitro*

Os zigotos foram transferidos para um tubo cônico de 15 mL (Costar, 3218) contendo 500 µL de TCM modificado e agitado em “vórtex” a 1800 rpm durante 2 min para a remoção das células do *cumulus oophorus*. Após, foram lavados três vezes e transferidos para o cultivo em meio SOF modificado (Tervit *et al.*, 1972), contendo 107,7 mM NaCl (Sigma, S-5886), 7,2 mM KCl (Sigma, P-5405), 1,2 mM KH₂PO₄ (Sigma, P-5655), 1,7 mM CaCl₂ (Sigma, C-7902), 0,48 mM MgCl₂ (Sigma, M-2393), 1,5 mM lactato de sódio (Sigma, L-4263), 25 mM NaHCO₃ (Sigma, S-5261), 1,5 mM glicose (Sigma, G-6152), 10 µg/mL vermelho de fenol (Sigma, P-5530), 50 µg/mL Gentamicina (Sigma, G-1264), 0,32 mM piruvato de sódio (Merck, 6619), 1 mM glutamina (Sigma, G-5763), 2% v/v solução de aminoácidos essenciais (Sigma, B-6766), 1% v/v solução de aminoácidos

não essenciais (Sigma, M- 7145) e 10% SVE. Os zigotos foram transferidos para gotas de cultivo (100 μ L) em grupos de 20, em placas de 35mm sob óleo mineral (Sigma, M-8410).

Controle do desenvolvimento embrionário

A taxa de clivagem foi observada 24 horas após o início do CIV e as taxas de blastocistos foram observadas no 7º dia de cultivo *in vitro*, considerando o momento da FIV como dia 0.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados pelo teste de qui-quadrado, com nível de significância de 5%.

2.5. RESULTADOS

TABELA 1: Taxa de clivagem de oócitos bovinos maturados em TCM-199 na presença de diferentes fontes protéicas e suplementação hormonal.

Fonte protéica	COM HORMÔNIO			SEM HORMÔNIO		
	Oócitos N	Clivagem		Oócitos N	Clivagem	
		N	%		N	%
SVE	110	70 ^{A,a}	63,6%	123	49 ^{B,a,d}	39,8%
SEE	131	70 ^{A,a}	53,4%	139	78 ^{A,b,c}	56,1%
SFB	134	75 ^{A,a}	56,0%	108	54 ^{A,a,c}	50,0%
BSA	128	54 ^{A,b,c}	42,2%	122	51 ^{A,a,d}	41,8%
PVP	89	45 ^{A,a,b}	50,6%	121	48 ^{A,a,d}	39,7%
NENHUMA	123	52 ^{A,b,c}	42,3%	130	48 ^{A,d}	36,9%

^{A,B} Letras desiguais na mesma **linha** diferem significativamente ($p < 0,05$).

^{a, b, c, d} Letras desiguais na mesma **coluna** diferem significativamente ($p < 0,05$).

A Tabela 1 mostra que, quando o meio de maturação foi suplementado com hormônios, os oócitos maturados na presença de SVE e SFB apresentaram taxas de clivagem significativamente mais elevadas do que aqueles maturados na presença de BSA e sem suplementação.

Sem a adição de hormônios, a maturação dos oócitos na presença de SEE, foi mais eficiente do que a maturação dos oócitos expostos a SVE, BSA, PVP e sem suplementação. Oócitos maturados na presença de SFB obtiveram maior taxa de clivagem do que aqueles maturados sem suplementação.

A suplementação hormonal proporcionou efeito positivo sobre a taxa de clivagem após a fecundação dos oócitos maturados com SVE, entretanto a adição de hormônios não interferiu nas taxas de clivagem nos demais tratamentos utilizados.

TABELA 2: Taxa de desenvolvimento embrionário, a partir de oócitos maturados em TCM-199 na presença de diferentes fontes protéicas e suplementação hormonal.

Fonte protéica	COM HORMÔNIO			SEM HORMÔNIO		
	Oócitos	Blastocistos		Oócitos	Blastocistos	
	N	N	%	N	N	%
SVE	110	30 ^{A,a}	27,3%	123	14 ^{B,a,c}	11,4%
SEE	131	23 ^{A,a}	17,6%	139	21 ^{A,c}	15,1%
SFB	134	23 ^{A,a}	17,2%	108	12 ^{A,a,b,c}	11,1%
BSA	128	10 ^{A,b}	7,8%	122	8 ^{A,a,b}	6,6%
PVP	89	7 ^{A,b}	7,9%	121	8 ^{A,a,b}	6,6%
NENHUMA	123	8 ^{A,b}	6,5%	130	6 ^{A,b}	4,6%

^{A,B} Letras desiguais na mesma **linha** diferem significativamente ($p < 0,05$).

^{a, b, c, d} Letras desiguais na mesma **coluna** diferem significativamente ($p < 0,05$).

Pode-se verificar na Tabela 2, que com a adição de hormônios, os oócitos maturados na presença de soro (SVE, SEE e SFB) apresentaram maiores taxas de desenvolvimento embrionário até estágio de blastocisto em comparação aos maturados na presença de BSA, PVP ou sem suplementação.

A ausência da suplementação hormonal, com a adição de SEE proporcionou maior eficiência dos oócitos após a fecundação em desenvolverem-se até o estágio de blastocisto quando comparado com os oócitos maturados na presença de BSA, PVP e sem suplementação. Oócitos maturados na presença de SVE apresentam taxas de blastocisto significativamente maiores do que aqueles maturados sem suplementação.

A suplementação hormonal proporcionou efeito positivo sobre a taxa de formação de blastocistos dos oócitos maturados com SVE, entretanto a adição de hormônios não interferiu nas taxas de desenvolvimento at blastocisto nos demais tratamentos utilizados.

2.3. DISCUSSÃO

Os oócitos estacionados na prófase I da divisão meiótica continuam o processo da maturação após o pico de LH. Este processo inclui a realização de dois programas celulares, a maturação nuclear, onde ocorre a retomada da meiose, caracterizada pela quebra da vesícula germinal e progresso até metáfase II (Bevers *et al.*, 1997). A maturação citoplasmática é caracterizada por modificações estruturais das organelas que oportunizam a ocorrência da fecundação. Estas alterações citoplasmáticas são identificadas pela contínua deposição de lipídeos, bloqueio dos grânulos corticais à poliespermia e posicionamento dos ribossomos adjacentes aos cromossomos .

Existem diferenças marcantes entre a maturação *in vivo* e *in vitro*, a retomada da meiose e a maturação nuclear ocorrem mais rápido em oócitos maturados *in vivo*.(incluir bibliografia) Outro aspecto a ser levado em consideração de acordo com Gordon (2003) é a expressão gênica, onde os oócitos produzem diferentes proteínas se maturados *in vivo* ou *in vitro*.

A qualidade do oócito é determinada pela sua habilidade em sofrer a fecundação e proporcionar o desenvolvimento embrionário. Na seleção *in vitro* de oócitos para serem maturados, leva-se em consideração o aspecto morfológico da sua estrutura. Este critério é um dado subjetivo, que tem por finalidade prognosticar a competência da célula germinativa feminina em fecundar e desenvolver um indivíduo viável. Lonergan *et al.* (2003) comprovaram esta observação ressaltando que apesar de obter-se taxas de maturação nuclear em torno de 80%, somente 40% dos oócitos fecundados desenvolveram-se até o estágio de blastocisto.

O TCM-199 foi ou não adicionado com FSH e hCG para proporcionar condições similares entre os tratamentos. Usualmente a necessidade da presença de hormônios no meio é determinada pela suplementação protéica. A inativação de diferentes soros pode ocasionar uma desnaturação dos hormônios protéicos, e outros componentes (Isachenko, *et al.*, 1994). Pinyopummintr e Bavister (1991) ao contrário do procedimento utilizado pela maioria dos laboratórios, relataram que a utilização de soro não inativado teve atividade

semelhante em proporcionar desenvolvimento embrionário quando comparado ao soro inativado.

Independente do meio utilizado, definido, semidefinido e indefinido a suplementação protéica, como exemplos os soros utilizados nesse experimento, determinam a presença de hormônios protéicos para obter-se um ambiente próximo ao fisiológico. Não se podendo excluir a possibilidade dos oócitos maturados sem adição de hormônios realizarem fecundação e o posterior desenvolvimento embrionário. Levando-se em consideração as observações de Keskinetepe *et al.* (1995); Pinyopummintr e Bavister (1991) faz-se necessária a realização de experimentos que visem identificar meios onde seus componentes possam ser avaliados na utilização pelo oócito durante o período da maturação *in vitro*.

Na procura de um caminho alternativo que possibilite uma PIV mais eficiente no laboratório, testou-se o emprego do TCM-199 suplementado com PVP, na presença ou ausência da adição de hormônios, o que denominados de meio quimicamente definido. O PVP na presença de hormônios foi eficiente em proporcionar a maturação de oócitos competentes para fecundarem e realizarem a primeira clivagem. Observação já relatada por Saeki *et al.* (1991). O problema do TCM-199 suplementado com PVP é a inadequação para dar suporte ao desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, independentemente da adição ou não de hormônios.

Uma alternativa viável a suplementação de TCM-199 com PVP é a utilização de BSA, que Krisher *et al.* (1999) caracteriza como meio quimicamente semidefinido. Lamentavelmente adição de BSA ao meio de maturação não foi eficaz em proporcionar oócitos viáveis à fecundação e ao desenvolvimento embrionário. As taxas de clivagem e desenvolvimento até o estágio de blastocisto foram semelhantes ao controle negativo (TCM-199 sem suplementação), com ou sem adição hormonal. De acordo com Leibfried-Rutledge *et al.* (1986) a presença da BSA inibe a expansão das células do *cumulus oophorus*, modificando o padrão de mucificação das células da granulosa indispensável, segundo van den Hurk e Zhao (2005) para a diferenciação, maturação nuclear, maturação citoplasmática e atividade de transcrição genômica.

Uma fonte protéica que tem sido utilizada como suplemento ao meio de maturação de oócitos bovinos por alguns laboratórios de PIV é o SEE. Em nosso experimento observamos que quando o meio de maturação TCM-199 foi suplementado com SEE na ausência de hormônios a taxa de clivagem foi superior ao observado com o meio suplementado por SVE, SFB, BSA, PVP ou TCM-199 sem suplementação. Nas éguas a concentração de LH aumenta durante o estro chegando ao pico um a três dias após a ovulação, diferente do que ocorre nas vacas. Figueiró *et al.* (2002) mostraram ser possível produzir embriões, utilizando-se como fonte protéica o SEE sem a necessidade da suplementação com LH/FSH durante o processo de maturação dos oócitos.

Uma explicação para a não necessidade de adição de hormonal (FSH/LH) ao meio de maturação suplementado por SEE, segundo Figueiró *et al.* (2002), é a quantidade destes hormônios contidos nestas frações de soro que talvez sejam suficientes para suprir as necessidades dos oócitos. Além disso, o cultivo destaca que a principal vantagem da utilização do SEE como alternativa para o suplemento dos meios de maturação de oócitos bovinos é evitar a transmissão de doenças espécie-específicas. Outra vantagem é a facilidade de obtenção de grande quantidade deste soro em uma única coleta, quando comparado com a obtenção de soros de espécies bovinas.

Outra fonte protéica testada neste experimento foi o SFB. Saeki *et al.* (1991), investigaram o uso do SFB como suplemento protéico ao meio de maturação TCM-199. Relataram que o SFB possui influência positiva em relação às taxas de maturação nuclear e citoplasmática. Esta afirmação é justificada pela presença de hormônios no soro. Sendo que quando o meio não foi suplementado por SFB e adicionado de hormônios a frequência de oócitos fecundados que se desenvolveram até o estágio de blastocisto foi superior em comparação à suplementação protéica. Em nosso experimento ao contrário que foi descrito por Saeki *et al.* (1991), observamos que a suplementação do meio de maturação com SFB, proporcionou taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário até blastocisto semelhantes, com a adição ou não de FSH e hCG.

Testamos também a adição do SVE ao meio de maturação como um controle positivo, pois trata-se do suplemento protéico empregado nas rotinas do laboratório. Mozzaquatro *et al.* (2004) relataram que quando o meio de maturação foi suplementado por

SVE propiciou um maior número de blastocistos no cultivo *in vitro*, na comparação ao meio suplementado por PVA e BSA, dados similares aos observados em nosso experimento. Pinyopummintr e Bavister (1991) observaram que a adição de soro ao meio de maturação de oócitos bovinos estimulou a diferenciação de mórulas em blastocistos. Zuelk e Backett (1990), relataram que a presença de hormônios (e.g., estradiol 17 β , FSH, prolactina, etc) contidas no SVE apresentaram efeito positivo referente a fecundação e posterior desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos maturados *in vitro*. As concentrações hormonais (gonadotrofinas e esteróides) presentes no SVE são diferentes das observadas em soro coletado em outras fases do ciclo estral. Gordon. (2003) destaca que as concentrações basais de hormônios presentes no plasma sanguíneo, tem um aumento significativo no período do estro bovino. O pico de LH ocorre no mesmo período de tempo em que o estradiol se apresenta em altos níveis. Schellander *et al.* (1990) ressaltaram as concentrações hormonais presentes nesta categoria de soro podem explicar a superioridade dos resultados referentes à taxa de desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos maturados *in vitro*.

2.4. CONCLUSÃO

Os meios definidos suplementados com PVP e os meios indefinidos suplementados com SVE, SEE e SFB, na presença de hormônios proporcionaram a maturação de CCOs com maior competência em realizar a primeira divisão embrionária após a fecundação.

Os CCOs maturados em meio indefinido suplementado com SVE e hormônios apresentaram maior competência em fecundar e alcançar o estágio de blastocisto após sete dias de cultivo.

REFERÊNCIAS

- ALI, A.; SIRARD, M.A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 901-905, 2002.
- AVERY, B.; BAVISTER, B.D.; GREVE, T. Development of bovine oocytes, in vitro matured in a chemically defined protein-free medium, supplemented with different amino acid formulations. **Theriogenology**, v. 49, p. 306, 1998.
- BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Human Reproduction**, v. 1, p. 91-148, 1995.
- BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; van den HURK, R.; IZADYAR, F. Regulation and modulation of oocytes maturation in the bovine. **Theriogenology**, v. 47, p. 13-22, 1997.
- BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; HERMÉNÉGILDE, T.; BARNES, F.; SIRARD, M.A. Manipulation of follicular developmental to produce developmentally competent bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 38-43, 2002.
- BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for development competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 41, p. 54-62, 1995.
- BRACKETT, B.G.; ZUELKE, K.A. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 39, p. 43-64, 1993.
- CHOI, Y.H.; CARNEVALE, E.M.; SEIDEL JR., G.E.; SQUIRES, E.L. Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. **Theriogenology**, v. 56, p. 661-670, 2001.
- ECKERT, J.; NIEMANN, H. In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. **Theriogenology**, v. 43, p. 1211-1225, 1995.
- FIGUEIRÓ, G.M.; FIALHO, S.S.; BRUM, D.S.; PASIN, M.; RAUBER, L.P.; BERNARDI, M.L.; MEZZALIRA, A.; RUBIN, M.I.B.; SILVA, C.A.M. Produção *in vitro* de embriões bovinos com soro de égua em diferentes fases do estro. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 30, n. 1, p. 1-8, 2002.
- FIGUEIRÓ, G.M.; LEIVAS, F.G.; RAUBER, L.P.; FILHO, M.F.S.; TEICHMANN, C.E.; MEZZALIRA, A.; RUBIN, M.I.B.; MONDINO, C.A.S. Produção *in vitro* de embriões bovinos com soro de égua ou de vaca em estro com ou sem a adição de LH/FSH. **Ciência Rural**, v. 34, n.2, 2004.

- FUKUI, Y.; KIKUCHI, Y.; KONDO, H.; MIZUSHIMA, S. Fertilizability and developmental capacity of individually cultured bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 53, p. 1553-1565, 2000.
- GANDHI, A.P.; LANE, M.; GARDNER, D.K.; KRISHER, R.L. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. **Human Reproduction**, v. 15, n. 2, p. 395-401, 2000.
- GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. 2. ed. London: CAB Publishing, 2003.
- HAGEMANN, L.J.; BEAUMONT, S.E.; BERG, M.; DONNISON, M.J.; LEDGARD, A.; PETERSON, A.J.; SCHURMANN, A.; TERVIT, H.R. Development during single IVP of bovine from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. **Molecular Reproduction and Development**, v. 53, p. 451-458, 1999.
- HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 23-32, 1997.
- KAMISKA B.; KACZMAREK, L.; GRZELAKOWSKA-SZTABERT, B. The Regulation of G0-S transition in mouse T lymphocytes by polyamines. **Experimental Cell Research**, v. 191, n. 2, p. 239-245, 1990.
- KESKINTEPE, L.; BURNLEY, C.A.; BRACKETT, B.G. Production of viable blastocysts in defined in vitro conditions. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 1410-1417, 1995.
- KRISHER, R.L.; LANE, M.; BAVISTER, B.D. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 1345-1352, 1999.
- KRISHER, R.L. The effect of oocyte quality on development. **Journal Animal Science**, v. 82, (E. Suppl), p. E14-E23, 2004.
- ISACHENCO, V.V.; OSTASHKO, F.L.; ISACHENKO, E.F.; SOLER, C.; PEREZ, F. Effect of heart-inactivated and non-inactivated estrous cow sera on maturation of bovine oocytes. **Journal of Endocrinology**, v. 140, p. 212, 1994.
- LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; CRITSER E.S.; FIRST, N.L. Effects of fetal calf serum albumin on in vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocytes complexes. **Biology of Reproduction**, v. 35, p. 850-857, 1986.
- LONERGAN, P; SHARIF, H.; MONAGHAN, P.; WAHID, H.; GALLAGHER, M.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte morphology and embryo yield following maturation, fertilization and cultured in vitro. **Theriogenology**, v. 37, p. 248, 1992.
- LONERGAN, P.; KHATIR, H.; CAROLAN, C.; MERMILLOD, P. Bovine blastocyst production in vitro after inhibition of oocytes meiotic resumption for 24h. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, p. 355-365, 1997.

LONERGAN, P.; RIZOS D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M.P. Oocytes and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction Domestic Animal**, v. 38, p. 259-267, 2003.

MARQUANT-LEGUIENNE, B.; HUMBLLOT, P. Practical measures to improve in vitro blastocyst production in the bovine. **Theriogenology**, v. 49, p. 3-11, 1998.

MONAGHAN, P.; CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; SHARIF, H.; WAHID, H.; GORDON, I. The effect of maturation time on the subsequent in vitro development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 39, p. 270, 1993.

MOZZAQUATRO, F.D.; RUBIN, M.I.B.; SILVA, C.A.M.; TESSMAN, J.V.; RAUBER, L.P.; KURTZ Filho, M.; SCHERER, D.; BUNN, S. Produção *in vitro* de embriões bovinos em meio suplementado com fontes protéicas definidas e indefinidas. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 1, p. 101-106, 2004.

PARK, Y.S.; KIM, S.S.; KIM, J.M.; PARK, H.D.; BYUN, M.D. The effect of duration of in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent development, quality and transfer of embryos. **Theriogenology**, v. 64, p. 123-134, 2005.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; FIRST, N.L. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. **Theriogenology**, v. 24, n. 5, p. 537-549, 1985.

PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and development competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, p. 63-67, 1992.

PEÑA, J.E.; CHANG, P.L.; CHAN, L.K.; ZEITON, K.; THORTON, M. H.; SAUER, M.V. Supraphysiological estradiol levels do not affect oocyte and embryo quality in oocyte donation cycles. **Human Reproduction**, v.17, n. 1, p. 83-87, 2002.

PINYOPUMMINTR, T.; BAVISTER, B.D. In vitro-matured/in vitro-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 736-742, 1991.

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

SAEKI, K.; HOSHI, M.; LEIBFRIED- RUTLEDGE, M.L.; FIRST, N.L. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. **Biology of Reproduction**, v. 44, p. 256-260, 1991.

SANBUISHO, A.; THRELFALL, W.R. The influence of serum and gonadotropins on MIV and fertilization of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 34, p. 341-348, 1990.

SHELLANDER, K.; FUHRER, F.; BRACKETT, B.G.; KORB, H.; SCHLEGER, W. In vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrous cow serum. **Theriogenology**, v. 33, p. 477-485, 1990.

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

STRINGFELLOW, D. A.; GIVENS, M.D.; WALDROP, J.G. Biosecurity issues associated with current and emerging embryo technologies. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p. 93-102, 2004.

TAKAGI, M.; CHOI, Y.H.; KAMISHITA, H.; ACOSTA, T.J.; WIJAYAGUNAWARDANE, M.P.; MIYAMOTO, A.; MIYAZAWA, K.; SATO, K. Oocyte quality of small antral follicles coexisting with cystic follicles in the ovaries of the cow. **Animal Reproduction Science**, v. 51, n. 3, p. 195-203, 1998.

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

THOMPSON, J. G. Defining the requirements for bovine embryo culture. **Theriogenology**, v.45, p. 27-40, 1996.

van den HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717-1751, 2005.

WHITTINGHAM, D.G. Culture of mouse ova. **Journal of Reproduction and Fertility, Supplement**, v. 14, p. 7-21, 1971.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; KESKINTEPE, L.; MARTINS Jr., A.; SIRISATHIEN, S.; BRACKETT, B.; NIEMANN, H. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. **Human Reproduction**, v. 16, n. 5, p. 893-901, 2001.

YANG, N.S.; LU, K.H.; GORDON, I. In vitro fertilization (IVF) and cultured (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. **Theriogenology**, v. 33, p. 352, 1990.

ZUELKE, K.A.; BRACKETT, B.G. Luteinizing hormone-enhanced in vitro maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 784-787, 1990.