



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

*Efeito da Presença da Insulina-Transferrina-Selênio (ITS) e L-ácido*

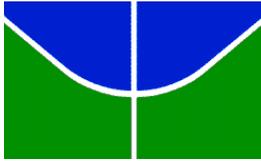
*Ascórbico (AA) na Produção in vitro de Embriões Bovinos*

SIDNEY ALCÂNTARA PEREIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

BRASÍLIA – DF

2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

***Efeito da Presença da Insulina-Transferrina-Selênio (ITS) e L-ácido  
Ascórbico (AA) na Produção in vitro de Embriões Bovinos***

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Animal da Universidade de  
Brasília como parte dos requisitos  
necessários para a obtenção do  
título de Mestre em Biologia Animal

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

BRASÍLIA – DF

2013

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais Selma Pereira de Souza Alcântara e Ronaldo de Oliveira Alcântara, pelo exemplo de força e perseverança, por nunca me desampararem mesmo quando precisavam de mais amparo do que eu, e pela família onde sempre encontro amor e carinho...

Ao Holy, amigo eterno, que da maneira mais simples e meiga sempre me compreende, mesmo quando todos me julgam.

Um Rei se aproxima, em passos sublimes, suas mãos refletem as lágrimas do pranto eterno... Lágrimas que formam um rio de sangue... Sangue que escorre pela face e chega até o coração desesperado.

Pés de um Rei, cheios de lágrima e sangue, correm em direção do choro. Quem enxugará a descontrolada cachoeira?

No humilhante cruzar da madeira, o sangue tinge as pedras aos seus pés. O pó volta a viver, o sopro de vida penetra mais uma vez e ao cair das águas cessa eternamente.

O Rei se aproxima, em passos estrondosos... Basta uma gota do mais precioso líquido, lágrima e sangue.

A passos largos ouço o trotar da Esperança que me resta... Em algum lugar deste deserto o vento enxuga o suor de sangue.

A testemunha (O vento)

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus avós: Felizarda (in memorian), Adélia (in memorian), José (in memorian) e Adenor por serem exemplos de maturidade e experiência.

Aos meus tios: Izabel (in memorian), Fabrício, Beto, Cida, Almira, Sônia e Suelena, pela ajuda financeira, por me acolherem em suas casas e por todo seu amor.

À minha primusca Eduarda que, sempre foi minha irmã, minha confidente, meu refúgio familiar e que sempre me apoiou e entendeu com um sorriso nos lábios ou gritando na minha cabeça. Admiro-te prima por toda a sinceridade e espontaneidade.

Ao meu amigo Danilo que, mesmo de longe participou de cada momento que eu vivi, sempre me ouvindo e não deixando de dar sua opinião de Testemunha que é. Admiro-te meu amigo por toda sua criatividade e capacidade de devanear comigo.

À minha amiga Carol que, por tanto tempo está ao meu lado, por me compreender como ninguém e por toda a fidelidade e confiança. Admiro-te Carolzinha por você ser uma pessoa que com tanta facilidade conquista a amizade do próximo.

À minha amiga Daniucha, por sempre estar pronta pra me ouvir (fala que te escuto) e dar maravilhosos conselhos e por compartilhar meus devaneios e filosofias. Admiro-te Dani por sua força e perseverança.

Ao meu amigo Paulo, por ter me compreendido nos momentos mais extravagantes da minha vida e por ser um exemplo de pessoa que deveras sabe cuidar e amar ao próximo.

À minha amiga Aninha (Baby), por ser um exemplo de força de vontade, sinceridade e descontração e por ter me tratado como um filho principalmente nos momentos em que mais precisei de conselhos primordiais.

Aos meus amigos Murilo (Preto), Isabela e Ana Carolina (Vesga), por sempre me ajudarem em todos os sentidos, pela convivência e amizade em momentos de alegria e tristeza e por serem minha família em Brasília.

Às minhas amigas Anelise e Andriele, pelos momentos divertidos que vivemos no LRA.

Às minhas amigas Rose e Janine, pelas festinhas, crepes e afins (rsrsrs).

Ao meu Amorzão Luís que, tem feito toda a diferença na minha vida, por ser tão precioso, atencioso, por cuidar de mim e por me completar em todos os sentidos.

À minha orientadora Margot Alves Nunes Dode, por toda sua contribuição e conhecimentos concedidos na área de Reprodução Animal.

Ao meu co-orientador Maurício Machaim Franco, pelos conhecimentos concedidos na área de Biologia Molecular.

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Animal por contribuir para a minha formação como mestre.

Aos órgãos financiadores e locais de realização deste trabalho: EMBRAPA CENARGEN, CAPES, UNB.

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1.	Ovogênese.....	4
2.2.	Maturação e competência ovocitária .....	6
2.3.	Fatores que afetam a maturação <i>in vitro</i> .....	9
2.4.	Insulina-transferrina-selênio (ITS) e associação com antioxidante .....	16
3.	HIPÓTESE .....	20
4.	OBJETIVOS .....	21
4.1.	Objetivo Geral .....	21
4.2.	Objetivos Específicos .....	21
5.	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
5.1.	Obtenção e classificação dos ovócitos.....	22
5.2.	Maturação <i>in vitro</i> (MIV) .....	23
5.3.	Fecundação <i>in vitro</i> (FIV) .....	24
5.4.	Cultivo <i>in vitro</i> (CIV) .....	25
5.5.	Mensuração dos embriões .....	25
5.6.	Coloração e contagem do número de células embrionárias.....	26
5.7.	Delineamento experimental.....	27
5.7.1.	Experimento 1: Efeito da suplementação do meio de MIV e CIV com ITS na produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos .....	28

5.7.2. Experimento 2: Efeito da presença de ITS associado ao AA durante a MIV na produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos .....	29
5.7.3. Experimento 3: Avaliação da cinética de maturação nuclear de ovócitos com diferentes graus de competência .....	30
5.7.4. Experimento 4: Efeito da presença de ITS associado ao AA durante às 12 últimas horas da MIV na capacidade de desenvolvimento de ovócitos menos competentes provenientes de folículos pequenos .....	31
5.8. Análise Estatística .....	32
6. RESULTADOS.....	34
6.1. Experimento 1: Efeito da suplementação do meio de MIV e CIV com ITS na produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos .....	34
6.2. Experimento 2: Efeito da presença de ITS associado ao AA durante a MIV na produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos .....	36
6.3. Experimento 3: Avaliação da cinética de maturação nuclear de ovócitos competentes e incompetentes.....	38
6.4. Experimento 4: Efeito da presença de ITS associado ao AA durante às 12 últimas horas da MIV na capacidade de desenvolvimento de ovócitos provenientes de folículos pequenos.....	40
7. DISCUSSÃO.....	43
8. CONCLUSÃO.....	51
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

## LISTA DE ABREVIÇÕES

% – Porcentagem  
μg – Micrograma  
μL – Microlitro  
μm – Micrômetro  
AA – Ácido ascórbico  
AI – Anáfase I  
ATP – Adenosina tri fosfato  
BSA – Albumina Sérica Bovina  
CCO – Complexos cúmulos-ovócito  
CIV – Cultivo in vitro  
CO<sub>2</sub> – Gás carbônico  
CP – Corpúsculo polar  
D0 – Dia zero  
D2 – Dia dois  
D6 – Dia seis  
D7 – Dia sete  
DMSO – Dimetilsufóxido  
DNA – Ácido dextrorribonucleico  
eCG – Gonadotrofina coriônica equina  
EGF – Fator de crescimento epidermal  
FIV – Fecundação in vitro  
FSH – Hormônio Folículo Estimulante  
GC – Grânulos corticais  
GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas  
GSH – Glutathione  
hCG – Gonadotrofina coriônica humana  
ITS – Insulina-transferrina-selênio  
LH – Hormônio Luteinizante  
MEM – Meio essencial mínimo  
MI – Metáfase I  
MII – Metáfase II  
MIV – Maturação in vitro  
mL – Mililitro  
mm – Milímetro  
mM – Milimol  
N – Número  
Na Cl – Cloreto de sódio  
O<sub>2</sub> – Oxigênio  
PA – Ativação paternogenética in vitro  
PBS – Solução salina fosfatada  
pi – Pós inseminação  
PIVE – Produção in vitro de embriões  
PMSG – Gonadotrofina de égua prenhe  
PVA – Álcool polivinílico

PVP – Polivinil-pirrolidona  
RNA – Ácido ribonucleico  
RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro  
SFB – Soro Fetal Bovino  
SOF – Fluido sintético de oviduto  
TCM 199 – Meio de cultivo tecidual 199  
TI – Telófase I  
TNCS – Transferência nuclear de células somáticas  
UI – Unidade internacional  
VG – Vesícula germinativa  
VGBD – Quebra da vesícula germinativa

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Maturação nuclear e citoplasmática. ....	7
<b>Figura 2:</b> Material utilizado para a dissecação dos folículos ( Lâmina de bisturi, tesouras e pinças) (A). Ocular graduada (Micrometer eyepiece OSM-4 Olympus®) para ser acoplada a lupa (B). ....	23
<b>Figura 3:</b> Mensuração de embriões em D7 de cultivo através do programa Motic (Moticam® Images Plus 3.0, Japan).....	26
<b>Figura 4:</b> Contagem do número total de células de embriões com diâmetro $\geq 160\mu\text{m}$ , expostos ao corante HOECHST 33342 (Sigma) e visualizados no microscópio de epifluorencência (Axiophot Zeiss® Germany- filtro 24, com comprimento de onda de 494/518nm de excitação/emissão) no aumento de 20x. ....	27
<b>Figura 5:</b> Diferentes fases da meiose em ovócitos provenientes de folículos de 6-8 mm dissecados, corados com lacmóide e avaliados em microscopia de contraste de fase no aumento de 100x. A) Vesícula germinativa (VG) (seta), B) Metáfase I (MI) (seta), C) Telófase I (TI) (seta), e D) Metáfase II (MII) apresentando a placa metafásica (seta) e o corpúsculo polar (CP). ....	31

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Efeito da presença da insulina-transferrina-selênio (ITS) no meio de maturação in vitro por 24 horas (ITS-MIV), no meio de cultivo in vitro (ITS-CIV) ou em ambos (ITS-MIV+ITS-CIV) sobre o desenvolvimento embrionário..... 34

**Tabela 2:** Efeito da presença da insulina-transferrina-selênio (ITS) no meio de maturação in vitro por 24 horas (ITS-MIV), no meio de cultivo in vitro (ITS-CIV) ou em ambos (ITS-MIV+ITS-CIV) sobre o tamanho de embriões em D7 de cultivo..... 35

**Tabela 3:** Efeito da presença da insulina-transferrina-selênio (ITS) no meio de maturação in vitro por 24 horas (ITS-MIV), no meio de cultivo in vitro (ITS-CIV) ou em ambos (ITS-MIV+ITS-CIV) sobre o número de células de embriões  $\geq 160\mu\text{m}$  em D7 de cultivo. .... 35

**Tabela 4:** Efeito da insulina-transferrina-selênio (ITS) e L-ácido ascórbico (AA) durante as 12 primeiras horas (ITS+AA-1<sup>a</sup>12hMIV), as 12 últimas horas (ITS+AA-2<sup>a</sup>12hMIV) e as 24 horas (ITS+AA-24hMIV) de maturação in vitro, sobre o desenvolvimento embrionário. .... 36

**Tabela 5:** Efeito da insulina-transferrina-selênio (ITS) e L-ácido ascórbico (AA) durante as 12 primeiras horas (ITS+AA-1<sup>a</sup>12hMIV), as 12 últimas horas (ITS+AA-2<sup>a</sup>12hMIV) e as 24 horas (ITS+AA-24hMIV) de maturação in vitro sobre o tamanho de embriões em D7 de cultivo..... 37

**Tabela 6:** Efeito da insulina-transferrina-selênio (ITS) e L-ácido ascórbico (AA) durante as 12 primeiras horas (ITS+AA-1<sup>a</sup>12hMIV), as 12 últimas horas (ITS+AA-2<sup>a</sup>12hMIV) e as 24 horas (ITS+AA-24hMIV) de maturação in vitro sobre o número de células de embriões  $\geq 160\mu\text{m}$  em D7 de cultivo. .... 38

**Tabela 7:** Cinética da maturação nuclear em ovócitos controle provenientes de folículos de 3-8mm obtidos por aspiração folicular e ovócitos obtidos de folículos de 1-3mm e de folículos de 6-8mm dissecados individualmente da córtex ovariana..... 39

**Tabela 8:** Efeito da insulina-transferrina-selênio (ITS) e L-ácido ascórbico (AA) durante as 12 primeiras horas de maturação in vitro (MIV) em ovócitos provenientes da aspiração d folículos de 3-8mm (ITS+AA 3-8mm) e em ovócitos provenientes de folículos de 1-3mm (ITS+AA 1-3mm) dissecados do ovário sobre o desenvolvimento embrionário..... 41

**Tabela 9:** Efeito da insulina-transferrina-selênio (ITS) e L-ácido ascórbico (AA) durante as 12 primeiras horas de maturação in vitro em ovócitos aspirados de folículos de 3-8mm (ITS+AA 3-8mm) e em ovócitos provenientes de folículos de 1-3mm (ITS+AA 1-3mm) dissecados sobre o tamanho de embriões em D7 de cultivo..... 42

**Tabela 10:** Efeito da insulina-transferrina-selênio (ITS) e L-ácido ascórbico (AA) durante as 12 primeiras horas de maturação in vitro em ovócitos provenientes de folículos de 3-8mm (ITS+AA 3-8mm) e em ovócitos provenientes de folículos de 1-3mm (ITS+AA 1-3mm) sobre o número de células de embriões  $\geq 160\mu\text{m}$  em D7 de cultivo. . 42

## RESUMO

Na tentativa de melhorar os índices da produção in vitro de embriões (PIVE) em bovinos, várias substâncias têm sido utilizadas na maturação in vitro (MIV) e no cultivo in vitro (CIV). A suplementação com a combinação de insulina-transferrina-selênio (ITS) e o ácido ascórbico (AA) têm sido associada com a redução na produção de radicais livres nos meios de cultivo celular, sendo uma alternativa para melhorar os resultados da PIVE. O presente estudo visou testar o efeito da presença do ITS e AA durante a MIV e/ou CIV na quantidade e qualidade de embriões PIVE. Complexos cumulus-ovócitos (COCs) foram obtidos de ovários de abatedouro, sendo que os provenientes de folículos de 1-3mm e 6-8mm foram dissecados da córtex ovariana e os de 3-8mm obtidos por aspiração folicular. Para avaliar os estágios da meiose os ovócitos foram corados com lacmóide, e para avaliar o efeito dos tratamentos na produção de embriões foi avaliada a taxa de clivagem (D2), blastocisto (D7), o tamanho dos embriões com auxílio da câmera Motic Images Plus 3.0 e o número total de células pela coloração HOESCH. Os dados de cinética de maturação, desenvolvimento embrionário, e tamanho dos embriões foram analisados pelo teste do Qui-Quadrado ( $P < 0.05$ ), e a contagem do número de células embrionárias pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0.05$ ). Inicialmente foi avaliado o efeito do ITS (0,5µg/ml) durante a MIV, durante o CIV e durante a MIV e o CIV. Todos os tratamentos apresentaram taxa de clivagem, produção de blastocisto e qualidade dos blastocistos semelhante ao grupo controle na ausência de ITS ( $P > 0,05$ ). A suplementação do meio com uma associação do ITS e AA por diferentes períodos (12h e 24h) durante a MIV, mostrou que quando realizada nas 12 últimas horas causa um aumento na produção de blastocistos em D7

(51,6%) quando comparado ao grupo controle (39,5%), e aos grupos expostos nas primeiras 12h (40,2%), e nas 24h (41,1%). Apesar do número de células ter sido maior nos embriões do grupo tratado com ITS e AA nas últimas 12h de MIV ( $143,2 \pm 49,9$ ) em relação aos grupos expostos nas primeiras 12h ( $122,3 \pm 46,1$ ), não diferiu ( $P > 0,05$ ) dos grupos controle ( $131,9 \pm 44,7$ ) e do tratado por 24h ( $124,3 \pm 35,3$ ). A cinética de maturação nuclear foi comparada em ovócitos de diferentes competências obtidos de folículos de 1-3 e 6-8mm de diâmetro, e foi observado que as 24h de maturação todos os ovócitos, independente do grupo, tinham completado a meiose sendo que em torno de 90% encontrava-se em estágio de MII. Então, foi investigado o efeito da presença do ITS associado ao AA nas 12 últimas horas da MIV em ovócitos com diferentes graus de competência. O tratamento não afetou ( $P < 0,05$ ) as taxas de clivagem e blastocisto quando ovócitos provenientes de folículos 1-3mm foram utilizados, sendo respectivamente 49,9% e 4,4% e 51,0% e 14,9% para os tratados e não tratados. Conclui-se que a adição de ITS isoladamente não afetou a produção de embriões, mas quando associado ao AA nas 12 últimas horas de maturação melhorou a quantidade e qualidade dos embriões produzidos. Além disso, o uso de ITS e AA durante a MIV não melhorou a competência de ovócitos provenientes de folículos pequenos.

**Palavras-chave:** ovócito, maturação in vitro, competência ovocitária

## ABSTRACT

In attempt to improve bovine in vitro embryos production (IVP), several substances have been used during the in vitro maturation (IVM) and in vitro culture (IVC). Supplementation with a combination of insulin-transferrin-selenium (ITS) and ascorbic acid (AA) have been associated with a reduction in free radicals production in cell culture media, being an alternative to improve the results of IVP. The present study aimed to test the effect of ITS and AA during IVM and / or IVC in the quantity and quality of IVP embryos. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were obtained from slaughterhouse ovaries. Which were either recovered from Follicles of 1-3mm and 6-8mm dissected from the ovarian cortex, or from aspiration of 3-8mm follicles. . To evaluate the stages of meiosis oocytes were stained with lacmóide, and to assess the effect of treatments on embryo production cleavage rate (D2), blastocyst rate (D7), size of the embryos using the camera Motic Images Plus 3.0 and the total number of cells staining by HOESCH, were evaluated. Data of maturational kinetics, embryonic development, and size of the embryos were analyzed by chi-square test ( $P < 0.05$ ), and embryonic cells number by Kruskal-Wallis test ( $P < 0.05$ ). Initially we investigated the effect of ITS (0.5 mg/ml) during IVM, IVM and IVC and during IVC. All treatments had similar cleavage rate, blastocyst production and embryo quality to the control group ( $P < 0.05$ ). Medium supplementation with a combination of AA and ITS for different periods (12h and 24h) during IVM, showed that when treatment was performed in last 12 h an increase in production D7 blastocysts (51.6%) was observed when compared the control (39.5%), first 12h (40.2%) and 24h groups (41.1%). Although the number of cells was higher in the group treated with ITS and AA in the last 12h of IVM ( $143.2 \pm$

49.9) than in groups exposed in the first 12h ( $122.3 \pm 46.1$ ), it did not differ ( $P > 0.05$ ) from the control ( $131.9 \pm 44.7$ ) and treated for 24h group ( $124.3 \pm 35.3$ ). The kinetics of nuclear maturation was compared between oocytes of different competence obtained from follicles of 1-3 and 6-8mm diameter, it was observed that the at 24h of maturation every oocyte, around 90% of the oocytes were in MII stage. Then, we investigated the effect of ITS associated with AA in the last 12 hours of IVM in oocytes with different degrees of competence. Treatment did not affect ( $P < 0.05$ ), the cleavage and blastocyst rate when oocytes from follicles 1-3mm were used, being respectively 49.9% and 4.4% and 51.0% and 14.9% for those treated and untreated. It was concluded that the addition of ITS alone did not affect the production of embryos, but when combined with AA in the last 12 hours of maturation improved quantity and quality of embryos produced. Furthermore, the use of AA and ITS during IVM not improve the competence of oocytes from small follicles.

**Keywords:** oocyte, in vitro maturation, oocyte competence



## 1. INTRODUÇÃO

A produção in vitro de embriões (PIVE) tem sido amplamente utilizada como mais uma alternativa para aumentar a produtividade em bovinos. Apesar dos inúmeros estudos realizados visando o aumento da eficiência da técnica, nesses últimos anos nenhuma melhora nas taxas de produção de embriões viáveis tem sido observada.

Dentre as etapas da PIVE, a maturação in vitro (MIV) é uma das mais críticas, pois os ovócitos utilizados nessa técnica são provenientes de uma população heterogênea de folículos e, conseqüentemente com diferentes graus de competência para completar a maturação nuclear e citoplasmática e se desenvolver adequadamente levando a gestação a termo (Revisado por Caixeta e Dode, 2010). Por outro lado, o cultivo embrionário in vitro por um período de 7 dias, está sujeito a vários fatores externos, que podem também afetar principalmente a qualidade dos embriões.

Dentre os ovócitos puncionados, aqueles provenientes de folículos menores têm menor capacidade de se desenvolver em um embrião saudável e continuar o seu desenvolvimento até o nascimento (Sirard et al., 2006; Revisado por Caixeta e Dode, 2010). Portanto, uma das alternativas para melhorar os índices de produção da PIVE seria aumentar o número de ovócitos disponíveis tornando aqueles provenientes de folículos pequenos mais aptos para maturação, à fecundação e para o subsequente desenvolvimento embrionário.

Na tentativa de melhorar a qualidade dos ovócitos, várias alternativas visando modificações no sistema de cultivo têm sido testadas. Dentre essas, pode-se citar,

mudanças na fonte proteica, suplementação com vários hormônios e substâncias protetoras e, alterações na atmosfera gasosa (Nagai, 2001; Kim et al., 2006; Tao et al., 2010; Córdova et al., 2010; Nguyen et al., 2011; Kere et al., 2013; Merton et al., 2013). Entretanto, na maioria dos estudos os índices de produção de blastocistos obtidos não ultrapassam 50% (Lee e Teixeira, 2009).

Durante a MIV e o cultivo in vitro (CIV) são produzidos radicais livres, sendo que altos níveis destes podem prejudicar o desenvolvimento dos ovócitos e embriões. Assim, uma alternativa para melhorar o ambiente para ovócitos e embriões seria adicionar antioxidantes nos meios (Chwa et al., 2006) auxiliando na proteção contra o estresse oxidativo que ocorre durante o cultivo in vitro.

A combinação de insulina-transferrina-selenio (ITS) tem sido utilizada na MIV proporcionando melhores resultados na taxa de maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos de suínos (Hu et al., 2011), na produção de embriões clones de suínos (Jeong et al., 2008) e na produção de embriões bovinos (Solovera et al., 2003). A insulina induz a captação de glicose e aminoácidos e tem atividade mitogênica e anti-apoptótica. A transferrina e selênio são oligoelementos que tem atividade antioxidante. A combinação desses elementos em meios de cultivo celular tem causado uma redução na produção de radicais livres e peroxidação de lipídios (Kim et al., 2005; Lee et al., 2005), além de outros efeitos benéficos ao ovócito.

Vários estudos têm mostrado que a adição de cisteamina, cisteína e beta-mercaptoetanol na MIV de ovócitos bovinos tem um efeito benéfico sobre a concentração de glutatona (GSH) e o subsequente desenvolvimento embrionário (De Matos e Furnus, 2000; Oyamada e Fukui, 2004; Merton et al., 2013). Apesar de a

glutationa possuir um papel chave na detoxificação e anti-oxidação de compostos exógenos e endógenos, outras substâncias com diferentes mecanismos podem ser utilizadas para reduzir o estresse oxidativo.

O ácido ascórbico (AA), por exemplo, tem um papel importante como antioxidante e certa concentração intracelular desta substância no ovócito parece ser essencial para a maturação citoplasmática. A sua adição no meio de cultivo melhorou a produção de blastocistos em camundongos (Tilly et al., 1995; Eppig et al., 2000) e na maturação in vitro melhorou o potencial de desenvolvimento de ovócitos de suínos (Tatemoto et al., 2001; Tao et al., 2010). Apesar de esse efeito não ter sido detectado em bovinos (Dalvit et al., 2005), essa pode ser uma alternativa para melhorar as condições do ambiente in vitro e com isso incrementar os resultados da PIVE.

Além disso, quando o ITS foi adicionado juntamente com ácido ascórbico, melhoraram a maturação citoplasmática e o desenvolvimento embrionário de ovócitos de fêmeas pré-pubere bovinas com 9 meses de idade (Córdova et al., 2010) e caprinas com 1-2 meses de idade (Hammami et al., 2012), que reconhecidamente são menos competentes para o desenvolvimento. Portanto, a adição de ITS e AA no meio de maturação são uma alternativa para melhorar a maturação in vitro, aumentando o potencial de desenvolvimento de ovócitos com baixa competência.

Apesar de estudos terem mostrado esses efeitos em suínos (Hu et al., 2011), e em caprinos (Hammami et al., 2012), há poucos relatos mostrando a influência do uso dessas substâncias durante a maturação in vitro de ovócitos e no cultivo in vitro de embriões em bovinos (Córdova et al., 2010) e, principalmente quando ovócitos menos competentes são utilizados.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Ovogênese**

A ovogênese consiste na formação de células haploides a partir de células germinativas primordiais diploides. Envolve várias divisões mitóticas e duas divisões meióticas. As divisões meióticas são assimétricas e resultam na formação de uma célula grande, o ovócito e dois pequenos resquícios de citoplasma contendo cromatina, chamados de corpúsculos polares. Diferente do macho em que os espermatozoides começam a ser formados na puberdade e são produzidos continuamente durante a vida reprodutiva, a fêmea, no momento do seu nascimento, tem presente no ovário uma população finita de ovócitos, sendo que todos já iniciaram a primeira divisão meiótica (Revisado por Chaigne et al., 2012).

Durante a vida fetal e pré-púbere ocorre recrutamento e crescimento folicular, porém os folículos não atingem a maturidade, não ocorrendo à ovulação. Somente quando a fêmea se torna púbere, em que há uma correta estimulação endócrina, os folículos continuam seu crescimento e chegam à ovulação. Então ocorre a maturação do ovócito e sua liberação em estágio de metáfase II pronto para ser fecundado (Revisado por Chaigne et al., 2012).

A formação do ovócito começa com a migração das células primordiais germinativas para as cristas genitais. Após a colonização destas, essas células que então são chamadas de ovogônias, param de se dividir mitoticamente, se diferenciam e dão origem aos ovócitos (Revisado por Sánchez e Smitz, 2012). Os ovócitos iniciam a meiose e param na fase de diplóteno da prófase I, estágio nuclear chamado de vesícula germinativa (VG), ocorrendo à formação do folículo primordial ainda na fase fetal. A

partir deste período, até o momento em que a fêmea atinge a puberdade ocorre crescimento ovocitário e folicular, além de alterações moleculares nos ovócitos, porém estes continuam retidos em VG e o folículo não chega ao estágio pré-ovulatório. Portanto, antes da puberdade todos os folículos que crescem no ovário entram em atresia (Revisado por Van den Hurk e Zhao, 2005).

Após a puberdade, os folículos em crescimento podem se tornar dominantes e continuarem crescendo até o estágio pré-ovulatório, quando por um estímulo hormonal, ou mais especificamente o pico de hormônio luteinizante (LH), são induzidos a ovular e a liberar o ovócito pronto para ser fecundado. Portanto, o LH além de induzir o rompimento da parede dos folículos também induz a maturação do ovócito. A maturação envolve a retomada da meiose com a quebra da vesícula germinativa, com o ovócito progredindo para metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI), ocorrendo assim a primeira e assimétrica divisão meiótica com extrusão do primeiro corpúsculo polar. Imediatamente, o ovócito atinge o estágio de metáfase II, ocorrendo à segunda interrupção da meiose, sendo que o ovócito permanece nesse estágio até ser fecundado, quando então, completa a segunda divisão meiótica e expulsa o segundo corpúsculo polar, formando o ovócito haploide fecundado (Revisado por Chaigne et al., 2012).

Na fase inicial da foliculogênese o crescimento do ovócito acompanha o crescimento folicular e vários eventos metabólicos ocorrem durante esse período. Estruturalmente o ovócito também sofre mudanças, como o surgimento da zona pelúcida e de novas organelas, além do aumento em seu tamanho que vai de 20 a 35µm em folículos primordiais a 110µm em média nos folículos antrais iniciais de 1-

3mm e 128µm em média nos folículos antrais tardios (Hyttel et al., 1997; Caixeta et al., 2009). Já na fase final da foliculogênese, apenas o folículo cresce em tamanho, os ovócitos que nessa fase já atingiram seu crescimento total sofrem modificações bioquímicas e morfológicas em preparação para a maturação.

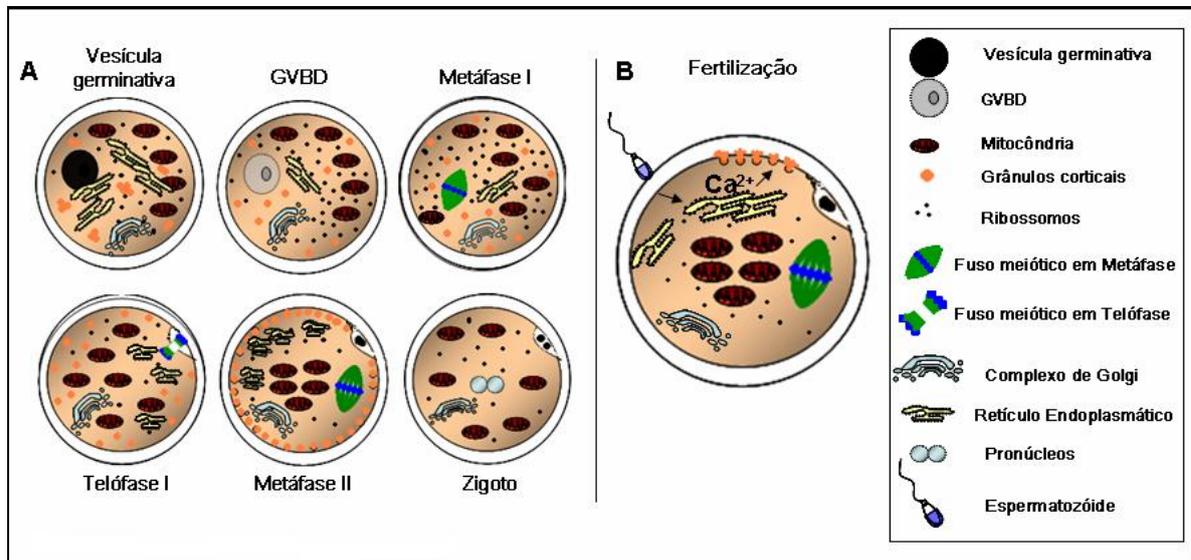
## **2.2. Maturação e competência ovocitária**

A maturação depende de uma série complexa de alterações nucleares e citoplasmáticas, as quais envolvem mudanças morfológicas e bioquímicas (Figura 1). Esses eventos são chamados de maturação nuclear e maturação citoplasmática (Mermillod et al., 2000).

A maturação nuclear corresponde à reorganização da rede de microtúbulos para o deslocamento dos cromossomos, condensação da cromatina, dissolução do envelope nuclear e separação dos cromossomos. Esses eventos levam a uma progressão de prófase I para metáfase I, anáfase I, telófase I, expulsão do primeiro corpúsculo polar e retenção no estágio de metáfase II (Cha e Chian, 1998).

A maturação citoplasmática é necessária para o ovócito adquirir condições de bloquear a polispermia, descondensar a cabeça do espermatozoide e formar pró-núcleos após a fecundação. Inclui a redistribuição de organelas celulares, a migração das mitocôndrias para uma posição perinuclear e o acúmulo de grânulos corticais no ovócito (Revisado por Van den Hurk e Zhao, 2005). Além disso, a maturação citoplasmática depende da maturidade do citoplasma do ovócito, denominada de competência, que se refere à capacidade deste de se desenvolver em um embrião

saudável e capaz de continuar o seu desenvolvimento até o nascimento (Sirard et al., 2006).



**Figura 1:** Maturação nuclear e citoplasmática. Fonte: Ferreira et al., 2009

A competência é adquirida progressivamente durante o crescimento do ovócito, entretanto o momento em que ela se completa e quais os mecanismos envolvidos ainda não estão claros. Mudanças moleculares podem ser responsáveis pelo aumento na competência dos ovócitos, já que durante o crescimento ovocitário há um alto grau de atividade transcricional. Esses eventos estão relacionados principalmente à síntese de RNAm e proteínas. Portanto o acúmulo de estoques moleculares é necessário para a fecundação e desenvolvimento embrionário posterior (Song e Wessel, 2005).

A síntese de transcritos é maior nas primeiras fases de desenvolvimento, período que coincide com a proliferação das células foliculares. Porém a transcrição no ovócito diminui marcadamente antes da maturação e, a partir deste ponto, continua em nível bem menor (Sirard, 2001; Sanchez et al., 2009; Bessa et al., 2013) . Isso

sugere que os transcritos e proteínas que foram estocados não são substituídos, pelo contrário, são gradualmente traduzidos ou degradados sendo importantes na fecundação e desenvolvimento embrionário até o momento em que o embrião seja capaz de ativar seu genoma (Sirard et al., 2006; Revisado por Sánchez e Smitz, 2012). Portanto, a competência do ovócito pode ser determinada pela quantidade de RNAm de origem materna que é estocado durante o crescimento e fase final da foliculogênese. Estes estoques diferem em ovócitos competentes e incompetentes, o que já tem sido demonstrado por vários autores (Dode et al., 2006; Caixeta et al., 2009; Racedo et al., 2009; Bessa, et al., 2013).

A aquisição da competência meiótica também está associada ao tamanho do folículo no qual o ovócito está inserido e conseqüentemente ao diâmetro ovocitário. Tem sido demonstrado em vários trabalhos (Lonergan et al., 1994; Blondin; Sirard, 1995; Hagemann et al., 1999; Machatkova et al., 2004; Lequare et al., 2005; Feng et al., 2007; Nowak-imialek et al., 2008; Racedo et al., 2009; Lodde et al., 2009; Sanchez et al., 2009; Caixeta et al. 2009) que ovócitos provenientes de folículos maiores têm maior potencial de desenvolvimento que os de folículos menores. Portanto, a utilização de diferentes tamanhos de folículos tem proporcionado a obtenção de ovócitos com diferentes graus de competência (Mourot et al. 2006; Caixeta et al., 2009; Bessa et al., 2013).

Outro modelo para avaliar a competência ovocitária é a utilização de ovócitos provenientes de animais pré-púbere (Córdova et al., 2010; Hammami et al., 2012), uma vez que a maior parte dos ovócitos provenientes dessas fêmeas ainda não atingiram a completa competência para o desenvolvimento embrionário subsequente

(Palma et al. 1993; Revel et al. 1995), diferentemente de ovócitos de fêmeas adultas, que já são mais competentes que os anteriores (Dode et al., 2006; Caixeta et al., 2009; Racedo et al., 2009; Bessa et al., 2013).

### **2.3. Fatores que afetam a maturação in vitro**

Além da competência ovocitária outros fatores tais como modificações feitas na composição do meio de maturação, temperatura de cultivo, atmosfera gasosa, suplemento proteico, hormônios, fatores de crescimento e substâncias antioxidantes também podem influenciar a maturação ovocitária e o subsequente desenvolvimento embrionário (Nagai, 2001; Ali e Sirard, 2002; Nam et al., 2005; Kim et al., 2006; Tao et al., 2010; Córdova et al., 2010; Nguyen et al., 2011; Merton et al., 2013; Kere et al., 2013).

Visando avaliar a suplementação proteica do meio MIV, Eckert e Niemann, (1995) afirmaram que a maturação do ovócito em meio sem fonte proteica é prejudicial para o desenvolvimento embrionário, porém outros autores evidenciaram que ovócitos bovinos maturados em meio sem a adição de proteínas tiveram, após a fecundação, desenvolvimento de embriões viáveis, desde que essa suplementação seja feita na fecundação e cultivo in vitro (Ali e Sirard, 2002; Rizo et al., 2002).

O soro fetal bovino (SFB) contém hormônios, fatores de crescimento, vitaminas, quelantes para metais pesados, peptídeos, proteínas, ácidos graxos, glicídios, entre outros componentes. Da mesma forma, a albumina sérica bovina (BSA) apesar de mais definido quando comparado a SFB, contém peptídeos, substratos energéticos e fatores de crescimento, essa gama de substâncias podem prejudicar o

entendimento de como se podem produzir meios para a MIV e a CIV que possam mimetizar as condições in vivo. Já as macromoléculas PVA e PVP são sinteticamente produzidas e, portanto bem definidas, permitindo assim um maior controle e entendimento das necessidades da MIV e CIV (Keskinetepe e Brackett, 1996; Gonçalves et al., 2002).

Ali e Sirard, (2002) observaram que o acréscimo de PVP ao meio de maturação aumentou a taxa de blastocistos quando comparado com o BSA e SFB. Em outro estudo, Mostromonaco et al. (2004) encontraram um aumento na expulsão do corpúsculo polar após 22 horas de MIV quando o SFB foi comparado com BSA.

Da mesma forma, os resultados da comparação da utilização de SFB ou BSA durante a maturação e /ou cultivo in vitro demonstraram que o uso de SFB nessas condições aumentou e adiantou o desenvolvimento embrionário e facilitou a eclosão dos embriões quando comparado com o uso de BSA nas mesmas condições (Oliveira et al., 2006). Portanto, a maioria dos trabalhos mostra que a utilização de SFB apresenta efeito benéfico na maturação ovocitária e desenvolvimento embrionário mediante outras fontes proteicas.

A tensão de oxigênio ( $O_2$ ) é outro fator importante para a maturação in vitro, existem basicamente dois tipos de cultivo, aquele com baixa tensão de  $O_2$  (5% de  $O_2$ ) e aquele com alta tensão de  $O_2$  (20% de  $O_2$ ). Hashimoto et al. (2000) verificaram que a utilização de 5% de  $O_2$  na maturação de ovócitos bovinos reduziu significativamente a viabilidade ovocitária, quando comparado à tensão de 20%.

Em outro estudo, Kikuchi et al. (2002) realizaram a maturação in vitro de ovócitos de suínos em atmosferas contendo 5% de  $O_2$  e 20% de  $O_2$ . Os resultados

demonstraram que não houve diferenças nas taxas de maturação nuclear e formação de blastocistos, porém o número total de células foi maior em embriões provenientes de ovócitos maturados em 5% de O<sub>2</sub>.

Em camundongos, Banwell et al. (2007) mostraram que diferentes concentrações de O<sub>2</sub> (2, 5 e 20%) não influenciaram a habilidade dos ovócitos de retomarem à meiose e serem fecundados. Por outro lado, Preis et al. (2007) observaram nessa mesma espécie que a utilização de 5% de O<sub>2</sub> na maturação de ovócitos favoreceu o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto em relação à concentração de 20%.

Em ovócitos de humanos, bovinos e suínos, estudos têm sugerido que 2% de O<sub>2</sub> podem afetar a fosforilação oxidativa e conseqüentemente a síntese de ATP, além de apresentarem alta correlação com anormalidades cromossômicas e diminuição na taxa de gestação (Chui et al., 1997). Por outro lado, 20% de O<sub>2</sub> representam uma condição não fisiológica, possibilitando o aumento do estresse oxidativo durante a maturação, contribuindo, assim, para a ocorrência de alterações citogenéticas (Banwell et al., 2007). Dessa forma, apesar da grande variação nos resultados, concentrações intermediárias, por se aproximarem dos níveis fisiológicos, parecem ser as mais benéficas durante a maturação ovocitária (Harvey, 2007).

A adição de hormônios (gonadotrofinas e esteroides) no meio de maturação, com a finalidade de propiciar a competência de desenvolvimento embrionário dos ovócitos mamíferos, após a fecundação in vitro (FIV), tem sido largamente investigado, porém os resultados são contraditórios. Enquanto algumas pesquisas têm demonstrado que somente o FSH é suficiente para promover o desenvolvimento

embrionário de ovócitos imaturos após maturação e fecundação in vitro (Eyestone e Boer, 1993), outras têm ressaltado o efeito benéfico somente do LH e/ou do estradiol (Dominko e First, 1992; Guler et al., 2000). Há também grupos de pesquisadores que têm demonstrado o efeito sinérgico de ambos: gonadotrofinas (FSH e LH) e estradiol (Wang et al., 1997; Van De Leemput et al., 1999; Hasler, 2000).

Outros trabalhos têm utilizado o PMSG (gonadotrofina de égua prenhe), também conhecido como eCG (gonadotrofina coriônica equina) que é uma molécula glicoproteica que mimetiza a atividade tanto de FSH como de LH, embora a atividade predominante seja do FSH. E também o hCG (gonadotrofina coriônica humana) que apresenta uma atividade biológica similar a do LH. Garcia et al. (1995) demonstraram a eficiência da utilização do PMSG associado ao hCG no meio de maturação durante a técnica de produção in vitro de embriões bovinos.

Dentre essas substâncias, o EGF (fator de crescimento epidermal), também tem sido utilizado como mais uma alternativa na suplementação dos meios de maturação in vitro para melhorar o desenvolvimento competente ovocitário. Quando adicionado em meios da MIV o EGF agiu como promotor de atividade meiótica e aumentou as taxas de maturação nuclear de ovócitos de suínos (Uhm et al., 2010).

Durante a MIV e CIV são produzidos radicais livres, sendo que altos níveis destes podem prejudicar o desenvolvimento dos ovócitos e embriões. Desta forma, uma alternativa para melhorar o ambiente de cultivo para ovócitos e embriões e mimetizar as condições foliculares seria adicionar antioxidantes nos meios (Chwa et al., 2006) auxiliando na proteção contra o estresse oxidativo que ocorre durante o cultivo in vitro.

A glutathiona (GSH) é um antioxidante natural presente no ovócito, tem papel importante na proteção contra os efeitos prejudiciais das espécies reativas de oxigênio. A síntese de GSH é dependente da disponibilidade de cisteína e de cisteamina, que por sua vez reduz cistina à cisteína, promovendo assim melhor captação da cisteína e aumento na síntese de GSH (Revisado por Deleuze e Goudet, 2010). Conseqüentemente a adição de cisteamina, aumenta a síntese de GSH em ovócitos de bovinos (Oyamada e Fukui, 2004).

Merton et al. (2013) avaliaram o efeito da suplementação com cisteamina durante a MIV e a CIV de ovócitos bovinos derivados de abatedouro ou OPU. Os resultados mostraram que ocorreu um acréscimo nas taxas de embriões produzidos e aumento da concentração de glutathiona durante a MIV, o que sugere uma melhora na competência ovocitária. Da mesma forma De Matos e Furnus (2000) avaliando o efeito da adição da cisteamina, cisteína e beta-mercaptoetanol durante a MIV de bovinos, observaram aumento na concentração de GSH e melhora do desenvolvimento embrionário subsequente.

Outro importante antioxidante lipossolúvel utilizado é o  $\alpha$ -tocoferol ou vitamina E, este está presente em células animais protegendo-as dos danos provocados pelos radicais livres (Olson e Seidel, 2000). Essa substância adicionada na MIV de ovócitos desnudos de suínos melhorou a taxa de blastocistos produzidos a partir desses ovócitos (Tao et al., 2010).

O ácido ascórbico (AA) também é um antioxidante que tem função no ovário como cofator da síntese de colágeno e amidação peptídica e facilitador do crescimento

folicular (Murray et al., 2001). A adição de ácido ascórbico no meio de cultura previne a apoptose em células foliculares (Tilly et al., 1995; Eppig et al., 2000).

Foi analisado em um estudo o efeito da adição de AA na vitrificação e no CIV sobre a morfologia e a viabilidade de folículos pré-antrais de ovinos. Os resultados mostraram que a adição de 50µg / ml de AA a uma solução de vitrificação à base de DMSO (Dimetilsulfóxido) para o tecido ovariano foi adequada na preservação da morfologia folicular, mas não da viabilidade ou da capacidade de desenvolvimento de folículos primordiais. O aumento das concentrações de AA no meio de vitrificação pode melhorar a viabilidade folicular e capacidade de desenvolvimento. No entanto, há risco de atividade pró-oxidante causada por uma dose excessiva de AA (Melo et al., 2011).

Da mesma forma, Rossetto et al. (2009) avaliaram os efeitos do ácido ascórbico e sua interação com o FSH sobre a morfologia, ativação e crescimento in vitro de folículos pré-antrais de caprinos. Os fragmentos ovarianos foram cultivados durante 1, 7, ou 14 dias em meio essencial mínimo (MEM) contendo AA (50 ou 100µg / mL), ou FSH (50ng / ml), ou as duas substâncias. Foi evidenciado que a combinação de 50µg / mL de AA e FSH mantiveram a integridade folicular e promoveram o crescimento e ativação folicular no cultivo em longo prazo de folículos pré-antrais de caprinos.

Tao et al. (2010) investigaram os efeitos da adição de diferentes doses de AA e de  $\alpha$ -tocoferol e também do co-cultivo in vitro com células do cúmulo sobre o potencial de desenvolvimento de ovócitos desnudados de suínos. Depois de 44 h de incubação, as taxas de maturação, de clivagem e de blastocisto após ativação partenogênica foram avaliadas. O AA na concentração de 500µM promoveu uma

melhora na maturação in vitro e no desenvolvimento embrionário, por outro lado 50 $\mu$ M de  $\alpha$ -tocoferol não aumentou a taxa de maturação in vitro, mas melhorou a taxa de blastocistos. O co-cultivo não melhorou as taxas de MIV, mas incrementou o desenvolvimento embrionário.

Kere et al. (2013) avaliou a dose-resposta em relação a suplementação do meio com ácido ascórbico sobre a MIV de ovócitos de suínos e o desenvolvimento embrionário a partir da técnica de ativação partenogénica in vitro (PA) ou pela técnica de clonagem. Foram usadas várias concentrações de AA (0, 25, 50 e 100 $\mu$ g/ml) nos meios de MIV e CIV. Os resultados mostraram que a adição de 50 $\mu$ g/ml de AA não afetou a maturação nuclear, mas melhorou as taxas de clivagem e blastocistos, além de aumentar o número total de células embrionárias, houve também uma redução dos níveis de radicais livres e apoptose e aumento na concentração de glutathione intracelular. Da mesma forma, no cultivo de embriões bubalinos com adição de antioxidantes (ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol) observou-se o aumento da taxa de desenvolvimento embrionário (Saikhun et al., 2008).

No entanto, resultados opostos foram encontrados em bovinos por Dalvit et al. (2005), uma vez que a avaliação do efeito da adição de AA juntamente com  $\alpha$ -tocoferol durante a MIV sobre a FIV e subsequente desenvolvimento embrionário não demonstrou incremento na produção de blastocistos e no aumento da competência ovocitária em relação ao grupo controle.

#### **2.4. Insulina-transferrina-selênio (ITS) e associação com antioxidante**

A insulina é um hormônio polipeptídico que tem uma importante atividade mitogênica (Herrler et al., 1992; Spicer e Echternkamp, 1995). Os embriões internalizam insulina materna através de endocitoses mediadas por receptores, e esta insulina proporciona uma estimulação da síntese de DNA e RNA, proteínas e lipídeos, regulando assim as funções celulares (Vedeler et al., 1991).

A avaliação do efeito da adição de insulina no crescimento folicular e na maturação de ovócitos de camundongos sobre a progressão meiótica e a remodelação da cromatina, mostrou que essa substância pode ter influência nos mecanismos de meiose ovocitária, remodelamento da cromatina e na competência para o desenvolvimento embrionário (Acevedo et al., 2007).

Em suínos, Lee et al. (2005) evidenciaram que a adição de insulina associada a metformina durante a MIV e CIV aumentou o potencial de maturação ovocitária e de desenvolvimento embrionário, além de incrementar as concentrações de GSH e de tirosina-quinase.

Já em outro estudo para determinar os efeitos da suplementação do meio de maturação, com a insulina humana ou bovina sobre as taxas de maturação, de FIV e de clivagem de ovócitos bovinos, Ocaña et al. (1998) demonstraram que com a adição de ambas as substâncias houve um aumento da percentagem de ovócitos maduros, melhorando subsequentemente os índices de fecundação e de clivagem in vitro.

A transferrina, além de participar como transportadora de ferro intracelular, também atua como uma molécula desintoxicante removendo metais tóxicos presentes

no meio de cultivo celular (Barnes e Sato, 1980). Além disso, tem ação como estimulante da proliferação celular (Ekblom, 1984).

O selênio é um importante elemento que atua em vários processos fisiológicos (Zang et al., 2006). Em cultivos celulares, onde há uma alta proporção de oxigênio atmosférico e conseqüentemente uma grande produção de radicais livres, o selênio previne o dano oxidativo reduzindo principalmente a quantidade de radicais livres e diminuindo a peroxidação de lipídeos (Tatemoto et al., 2004; Ebert et al., 2006). Além disso, o selênio é um constituinte do sítio ativo da enzima glutathiona peroxidase, regulando desta forma sua atividade biológica e indiretamente prevenindo o dano oxidativo nos cultivos celulares (Gronbaek et al., 1995).

A combinação das três substâncias insulina-transferrina-selênio (ITS) tem sido estudado como antioxidante usado em meios de cultivo celular reduzindo a produção de radicais livres e peroxidação de lipídios (Kim, et al., 2005; Lee, et al., 2005).

A adição de 10 mg/L de insulina, 5 mg/L de transferrina e 5.5 ng/L de selênio no meio de MIV juntamente com ácido polivinílico (PVA) ou líquido folicular de suíno melhorou a concentração de glutathiona, a habilidade dos ovócitos de formarem pro núcleos masculinos e o desenvolvimento competente de embriões clone e PIV (Jeong et al., 2008).

Da mesma forma, Hu et al. (2011) investigaram o efeito da adição de 1% de ITS associado ou não a outros hormônios como EGF, PMSG, HCG e FSH no meio MIV, durante 42 horas, sobre a maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos de suínos. Os resultados mostraram que o meio suplementado com 1% de ITS associado a outros

hormônios melhorou a maturação nuclear e citoplasmática, não havendo diferença quando o ITS foi utilizado sozinho.

Solovera et al. (2003) compararam o efeito de três meios de cultivo, um meio controle, um meio controle co-incubado com células epiteliais do oviduto bovino, e um meio controle suplementado com 5µg/mL ITS, sobre o desenvolvimento embrionário de ovócitos fecundados in vitro. Os resultados mostraram que o co-cultivo com células epiteliais do oviduto bovino e a adição de ITS no meio melhoraram as taxas de blastocistos em estágio mais avançado de cultivo, sendo que o último tratamento foi superior em produção de embriões viáveis quando comparado com os demais.

Outro estudo investigou o efeito da suplementação do meio de cultivo in vitro com ITS na produção de embriões suínos por PA, por FIV ou por transferência nuclear de células somáticas (TNCS). Os dados encontrados sugeriram que a adição de ITS no meio de cultivo in vitro exerceu um efeito benéfico, já que melhorou o desenvolvimento in vitro, aumentou a capacidade de expansão e de eclosão de blastocistos, e o número total de células por blastocisto na técnica de PA, em embriões FIV e TNCS também aumentou o desenvolvimento in vitro, mas não teve um efeito significativo nos outros parâmetros avaliados (Das et al., 2013).

Hammami et al. (2012) testaram o efeito conjunto da suplementação do meio com ITS e AA e vários níveis hormonais durante diferentes períodos da MIV de ovócitos de cabra pré-púbere sobre a produção e qualidade de blastocistos. A adição de AA, ITS e um baixo nível de hormônios durante as primeiras 12 horas de MIV nos ovócitos pré-púberes mantiveram a qualidade intrínseca dos blastocistos produzidos in

vitro, aumentando assim a sua sobrevivência durante o processo de criopreservação, porém não houve acréscimo na quantidade de blastocistos produzidos.

Outro estudo examinou os efeitos da adição de ITS e / ou AA em um meio convencional para a maturação de ovócitos de bezerras pré-púbere, sobre a organização cromossômica, a distribuição dos grânulos corticais (GC), e o desenvolvimento embrionário. Complexos cumulus-ovócitos (CCOs) foram maturados em meio TCM 199 contendo PVA e EGF (controle) e suplementado com ITS e / ou AA nas 12 primeiras horas ou 24 h de MIV. Os resultados indicaram que a capacidade de desenvolvimento dos ovócitos pré-púberes maturados in vitro foi melhorada quando estes foram maturados na presença do ITS e AA nas primeiras 12 horas. Também foi relevante a correlação positiva desse grupo com o aumento do nível de expressão de ciclina B1, a distribuição periférica dos grânulos corticais e o aumento da taxa de blastocistos (Córdova et al., 2010).

A adição de ITS e AA nos meios de MIV e CIV além de ser viável para melhorar a condições de maturação ovocitária e cultivo embrionário também pode ser uma alternativa para aumentar a competência de ovócitos provenientes de folículos pequenos.

### **3. HIPÓTESE**

A utilização de ITS e AA na produção in vitro de embriões bovinos melhoram as condições de cultivo e, conseqüentemente o desenvolvimento e qualidade embrionária.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo Geral**

Testar a influência da presença do ITS e AA durante a maturação in vitro e/ou cultivo in vitro, sobre a produção e qualidade de embriões PIV.

### **4.2. Objetivos Específicos**

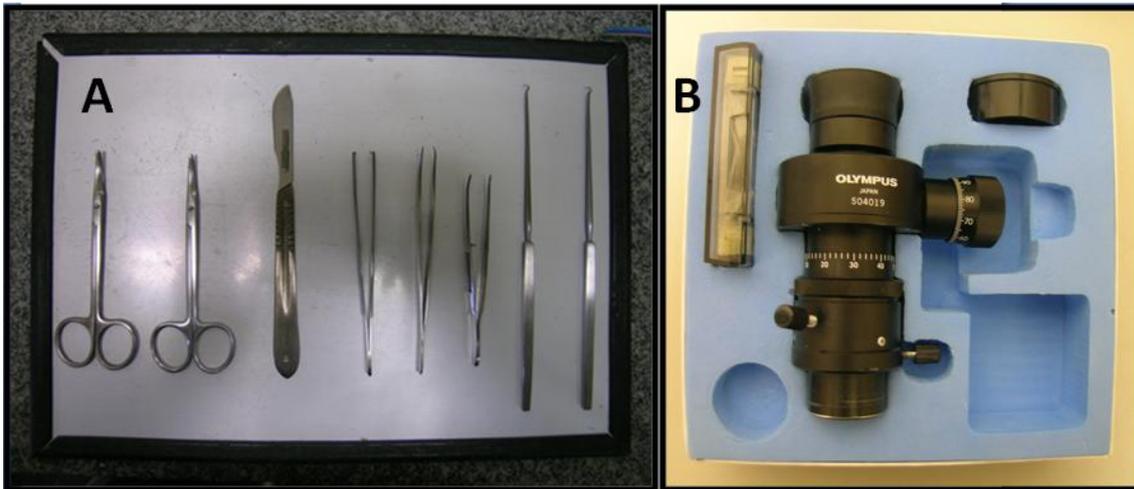
- a) Avaliar o efeito da suplementação dos meios MIV e CIV com ITS na produção in vitro de embriões bovinos.
- b) Avaliar o efeito da presença de ITS associado ao AA durante diferentes períodos da MIV na produção in vitro de embriões bovinos.
- c) Avaliar a cinética da maturação nuclear de ovócitos com diferentes graus de competência (menos competentes obtidos de folículos de 1-3mm e mais competentes de 6-8mm).
- d) Avaliar o efeito da presença de ITS associado ao AA nas 12 últimas horas da MIV de ovócitos com diferentes graus de competência.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Obtenção e classificação dos ovócitos

Os ovários de fêmeas bovinas mestiças adultas foram coletados em abatedouro local e transportados até o laboratório em solução salina (NaCl 0,9%) acrescida de antibióticos (penicilina G - 100 UI/ml e estreptomicina - 100 µg/ml – Sigma, Sto Louis MO, USA), à temperatura de 35 a 37°C. No laboratório, os ovários foram lavados em NaCl 0,9% e os folículos com diâmetro de 3–8mm foram aspirados com auxílio de bomba a vácuo. Somente os ovócitos classificados em Grau 1 e 2 foram utilizados (Caixeta e Dode, 2008).

Para obtenção de ovócitos com diferentes graus de competência foi utilizado o modelo descrito por Caixeta e Dode, (2008) em que os folículos foram dissecados do córtex ovariano um a um (20-30 ovários) com o auxílio de tesoura, bisturi e pinças, e mensurados através de uma ocular graduada (Micrometer eyepiece OSM-4 Olympus®) em estereomicroscópio (Figura 2). Sendo que dois grupos foram utilizados, os de folículos de 1-3mm (representando os incompetentes) e os de 6-8mm de diâmetro (representando os competentes). Após a mensuração os complexos cumulus-ovócito (COCs) foram liberados por ruptura dos folículos e, classificados de acordo com o aspecto e distribuição das células do cúmulo e uniformidade do citoplasma. Somente os ovócitos classificados como Grau 1 e 2 foram utilizados (Caixeta e Dode, 2008). Todo o procedimento foi realizado em meio de lavagem (TCM-199 com sais de Hank's [Gibco, NY, USA] suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino [(SFB) – Gibco BRL, Burlington, ON, Canada] e 0,075 mg/mL de amicacina (Sigma).



**Figura 2:** Material utilizado para a dissecação dos folículos ( Lâmina de bisturi, tesouras e pinças) (A). Ocular graduada (Micrometer eyepiece OSM-4 Olympus®) para ser acoplada a lupa (B).

O tempo utilizado para dissecação foi de 1 hora e para realização dos demais procedimentos, como abrir os folículos e armazenar ou colocar para maturar os ovócitos, mais 1 hora. Portanto, o tempo de manipulação não ultrapassou 2 horas para todo o processo, desde a dissecação até o momento em que os ovócitos foram armazenados ou colocados para maturar.

## **5.2. Maturação *in vitro* (MIV)**

Os ovócitos selecionados de cada categoria de folículo foram lavados em meio de maturação (MIV) constituído de TCM-199 com sais de Earl's (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino SFB (Gibco), 0,075 mg/mL de amicacina e 0,01UI/mL de Hormônio Folículo Estimulante (FSH, Sigma) e então transferidos para gotas de 50 $\mu$ l (quando colocados até 10 ovócitos), gotas de 100 $\mu$ l (quando colocados 11 a 20

ovócitos) ou gotas de 200µl (quando colocados 20 a 30 ovócitos) do meio MIV, cobertas com óleo mineral. As placas contendo as gotas de meio MIV com os COCs foram então incubadas a 39°C em atmosfera contendo 5% CO<sub>2</sub> em ar, por 24 horas.

### 5.3. Fecundação in vitro (FIV)

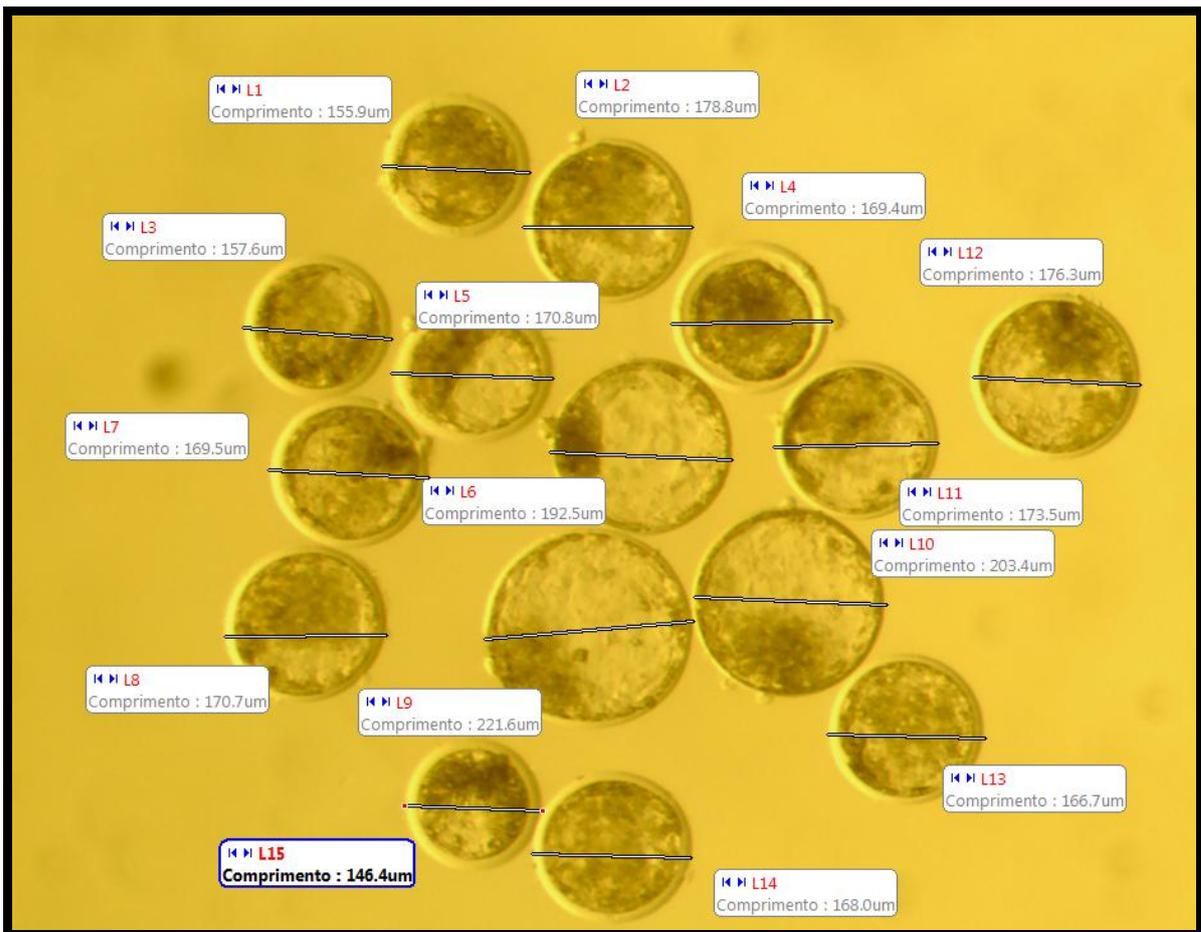
Para a fecundação foi utilizado sêmen congelado de touro da raça Nelore, previamente testado para o sistema de PIV de embriões do Laboratório de Reprodução Animal- LRA-I- Embrapa/Recursos Genéticos e Biotecnologia. O sêmen foi descongelado a uma temperatura de 36-37°C em banho-maria e posteriormente selecionado por gradiente de *Percoll*<sup>TM</sup> (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) 90% (400µl) e 45% (400µl), preparados em microtubos de 2ml, centrifugado a 5400g durante 5 minutos (Machado et al. 2009). Após a passagem pelo *Percoll*<sup>TM</sup>, o sêmen foi lavado em 1ml de meio TALP (Parrish et al. 1995) e novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores. O *pellet* obtido foi ressuspenso em meio de fecundação que consistia de meio TALP suplementado com 2mM de penicilamina, 1mM de hipotaurina (Sigma), 250mM de epinefrina (Sigma) e 10µg/ml de heparina (Sigma). A dose inseminante foi ajustada de forma a se obter uma concentração final de 1x10<sup>6</sup> espermatozoides/ml. Os espermatozoides e ovócitos foram co-incubados durante 18 a 20 horas à 39°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> em ar, sendo o dia da FIV considerado o Dia zero (D0).

#### **5.4. Cultivo in vitro (CIV)**

Dezoito a vinte horas pós-inseminação (pi), os possíveis zigotos foram parcialmente desnudados através de sucessivas pipetagens e em seguida lavados e transferidos para gotas de meio de fluido sintético de oviduto (SOF), suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais 0,34 mM de sódio tri citrato, 2,77mM de myo-inositol e 5% de SFB (SOFaaci- Holm et al. 1999), cobertas com óleo mineral e incubados a 39° C em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> em ar. O desenvolvimento embrionário foi avaliado pela taxa de clivagem no D2, e produção de blastocistos nos D6 e D7 pós-inseminação (pi).

#### **5.5. Mensuração dos embriões**

No D7 os embriões foram fotografados e mensurados incluindo a zona pelúcida através do programa Motic (Moticam® Images Plus 3.0, Japan). De acordo com o diâmetro os embriões foram divididos em três grupos: 120 a 140µm, 140 a 160µm e ≥160µm (Figura 3).

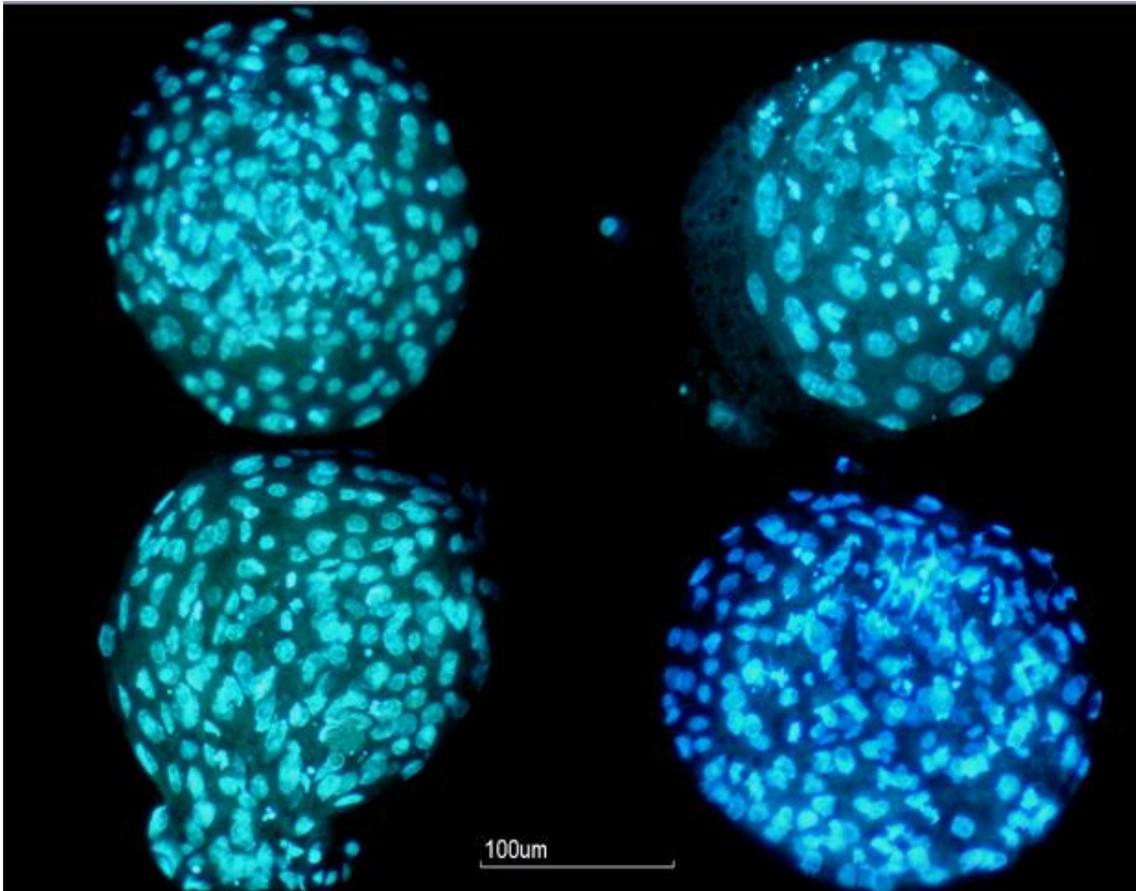


**Figura 3:** Mensuração de embriões em D7 de cultivo através do programa Motic (Moticom® Images Plus 3.0, Japan).

### 5.6. Coloração e contagem do número de células embrionárias

Depois de mensurados aqueles embriões que apresentavam diâmetro  $\geq 160\mu\text{m}$  foram expostos ao corante HOECHST 33342 (Sigma) na concentração de  $1\mu\text{g/ml}$  diluído em PBS (Solução salina fosfatada), onde permaneceram por cinco minutos e logo após foram colocados em lâminas e cobertos com lamínulas. Os embriões foram então, levados ao microscópio de epifluorescência (Axiophot Zeiss® Germany- filtro 24,

com comprimento de onda de 494/518nm de excitação/emissão) onde o número de núcleos de células foi contado no aumento de 20x (Figura 4).



**Figura 4:** Contagem do número total de células de embriões com diâmetro  $\geq 160\mu\text{m}$ , expostos ao corante HOECHST 33342 (Sigma) e visualizados no microscópio de epifluorescência (Axiophot Zeiss® Germany- filtro 24, com comprimento de onda de 494/518nm de excitação/emissão) no aumento de 20x.

### 5.7. Delineamento experimental

Para avaliar o efeito da alteração dos meios de maturação e/ou de cultivo no desenvolvimento e qualidade dos embriões produzidos in vitro foi utilizada a

combinação de insulina, transferrina e selênio (ITS, I1884, Sigma) associada ou não ao L-ácido ascórbico (AA, A4544, Sigma) sendo realizados 4 experimentos.

#### **5.7.1. Experimento 1: Efeito da suplementação do meio de MIV e CIV com ITS na produção *in vitro* de embriões bovinos**

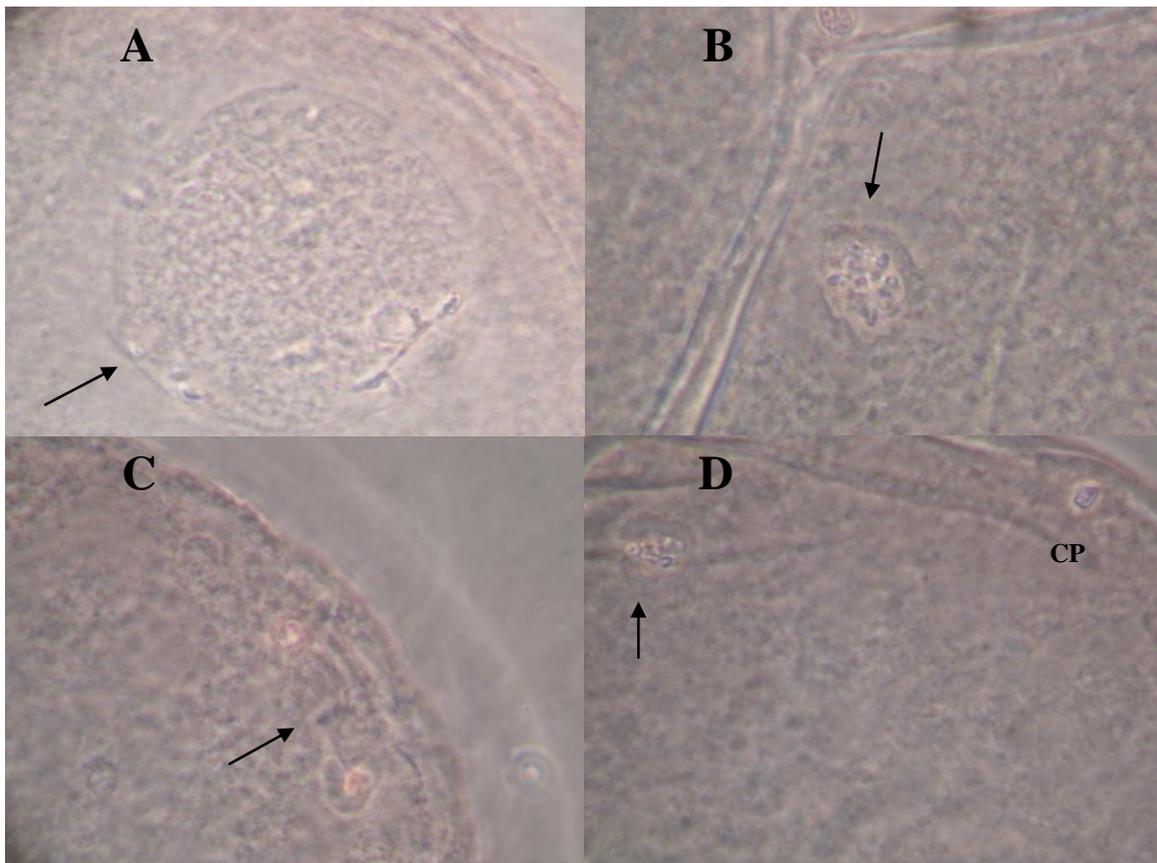
O objetivo desse experimento foi avaliar se a presença de ITS durante a MIV e durante o CIV afeta a produção *in vitro* de embriões. A concentração de ITS presente nos meios foi de 0,5µg/mL de ITS (insulina 10mg/L; transferrina 5.5 mg/L; selênio 5 µg/L) para todos os tratamentos. Nesse experimento foram utilizados 1549 ovócitos aspirados, provenientes de folículos de 3-8mm, que foram distribuídos em quatro tratamentos: 1) controle (C): ovócitos e embriões foram cultivados na ausência de ITS; 2) presença de ITS durante a MIV (ITS-MIV): em que os ovócitos foram maturados no meio de maturação suplementado com ITS por 24 horas; 3) presença de ITS durante a maturação e cultivo (ITS-MIV-CIV): em que os meios de maturação e cultivo foram suplementados com ITS; e, 4) presença de ITS durante o cultivo (ITS-CIV), em que o meio de cultivo embrionário foi suplementado com ITS. Em todos os tratamentos foram avaliadas as taxas de clivagem (48h pi) e as taxas de blastocistos nos dias 6 (D6) e 7 (D7) de cultivo. Em D7 todos os embriões tinham o seu diâmetro medido e, aqueles  $\geq 160\mu\text{m}$  eram corados e avaliados quanto ao número total de células.

### **5.7.2. Experimento 2: Efeito da presença de ITS associado ao AA durante a MIV na produção *in vitro* de embriões bovinos**

No experimento 1 não foi encontrada diferença na produção de embriões quando o ITS estava presente durante a MIV, CIV ou ambos. Então, nesse experimento foi avaliado se a suplementação de ITS associado com ao AA durante a MIV não beneficiaria os ovócitos melhorando a capacidade de produzirem embriões. As concentrações de ITS e AA utilizadas em todos os grupos foram de 0,5mg/mL e 100µg/mL, respectivamente. Um total de 866 ovócitos aspirados, provenientes de folículos de 3-8mm, foram distribuídos em quatro grupos: 1) controle (C), ovócitos e embriões foram cultivados na ausência de ITS e AA; 2) presença de ITS e AA durante a MIV (ITS+AA-1ª12hMIV), em que os ovócitos foram maturados no meio de maturação suplementado com ITS e AA nas primeiras 12 horas de maturação; 3) presença de ITS e AA durante a MIV (ITS+AA-2ª12hMIV), em que os ovócitos foram maturados no meio de maturação suplementado com ITS e AA nas últimas 12 horas de maturação; e 4) presença de ITS e AA durante a MIV (ITS+AA-24hMIV), em que os ovócitos foram maturados no meio de maturação suplementado com ITS e AA nas 24 horas de maturação. Após a maturação os ovócitos dos diferentes tratamentos foram fecundados e cultivados *in vitro*. Foram avaliadas as taxas de clivagem (48hpi) e as taxas de blastocistos nos dias 6 (D6) e 7 (D7) de cultivo. Em D7 todos os embriões tinham o seu diâmetro medido e, aqueles  $\geq 160\mu\text{m}$  eram corados e avaliados quanto ao número total de células.

### **5.7.3. Experimento 3: Avaliação da cinética de maturação nuclear de ovócitos com diferentes graus de competência**

O objetivo deste experimento foi verificar se a retomada e progressão da meiose ocorrem de forma semelhante em ovócitos com diferente grau de competência. Para isso, foram utilizados pelo menos 50 ovócitos de cada um dos três grupos, em três momentos da maturação. Os grupos utilizados foram ovócitos menos competentes (obtidos de folículos de 1-3mm dissecados do ovário), ovócitos mais competentes (obtidos de folículos de >6mm dissecados do ovário) e, ovócitos controle (ovócitos normalmente utilizados para MIV, aspirados de folículos de 3-8mm de diâmetro). Ovócitos de cada um desses grupos foram colocados para maturar, sendo retirados do cultivo às 0, 8 e 24 horas. Em cada um dos momentos os ovócitos foram transferidos para uma gota de 500µl de PBS e submetidos à sucessivas pipetagens até estarem completamente livres de células do cúmulus. Os ovócitos desnudos foram lavados e fixados em etanol e ácido acético (3:1) por pelo menos 48 horas. Após a fixação os ovócitos foram corados com corante lacmóide e avaliados em microscópio de contraste de fase. Os ovócitos foram classificados de acordo com o estágio da meiose em vesícula germinativa (VG), quando o envoltório da vesícula estiver intacto e a cromatina estiver descondensada, vesícula germinativa rompida (VGBD) quando o envoltório da vesícula estiver rompido em qualquer ponto e a cromatina estiver condensada, metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI) e metáfase II (MII) com a presença do corpúsculo polar (CP) (Figura 5). Foram considerados anormais os ovócitos que apresentavam qualquer tipo de aberração cromossômica, degeneração e cromatina difusa e indefinida.



**Figura 5:** Diferentes fases da meiose em ovócitos provenientes de folículos de 6-8 mm dissecados, corados com lacmóide e avaliados em microscopia de contraste de fase no aumento de 100x. A) Vesícula germinativa (VG) (seta), B) Metáfase I (MI) (seta), C) Telófase I (TI) (seta), e D) Metáfase II (MII) apresentando a placa metafásica (seta) e o corpúsculo polar (CP).

#### **5.7.4. Experimento 4: Efeito da presença de ITS associado ao AA durante às 12 últimas horas da MIV na capacidade de desenvolvimento de ovócitos menos competentes provenientes de folículos pequenos**

O objetivo desse experimento foi avaliar se a suplementação de ITS associado com o AA durante as 12 últimas horas da MIV aumentaria a qualidade de ovócitos provenientes de folículos pequenos aumentando a capacidade de produzirem

embriões. As concentrações de ITS e AA utilizadas em todos os grupos foram de 0,5µg/mL e 100µg/mL, respectivamente. Foram utilizados 284 ovócitos aspirados de folículos de 3-8mm, os quais são rotineiramente utilizados para a PIV e 92 ovócitos obtidos de folículos de 1-3 mm dissecados individualmente dos ovários. Portanto um total de 376 ovócitos foi distribuído em quatro grupos: 1) controle (Controle 3-8mm), ovócitos aspirados provenientes de folículos de 3-8mm e maturados na ausência de ITS e AA; 2) presença de ITS e AA durante a MIV (ITS+AA 3-8mm), em que os ovócitos aspirados provenientes de folículos de 3-8mm foram maturados no meio de maturação suplementado com ITS e AA nas últimas 12 horas de maturação; 3) controle (Controle 1-3mm), ovócitos provenientes de folículos de 1-3mm dissecados, maturados na ausência de ITS e AA; e 4) presença de ITS e AA durante a MIV (ITS+AA 1-3mm), em que os ovócitos provenientes de folículos de 1-3mm dissecados foram maturados no meio de maturação suplementado com ITS e AA nas últimas 12 horas de maturação. Após a maturação os ovócitos dos diferentes tratamentos foram fecundados e cultivados *in vitro*. Foram avaliadas as taxas de clivagem (48h pi) e as taxas de blastocistos nos dias 6 (D6) e 7 (D7) de cultivo. Em D7 todos os embriões tinham o seu diâmetro medido e, aqueles  $\geq$  que 160µm eram corados e avaliados quanto ao número total de células.

## **5.8. Análise Estatística**

Os dados de desenvolvimento embrionário, categoria de tamanho dos embriões e cinética da maturação foram analisados pelo teste do Qui-Quadrado ( $P < 0,05$ ) e a contagem do número de células embrionárias pelo teste de Kruskal-Wallis

( $P < 0,05$ ). Para as avaliações estatísticas foi utilizado o programa Prophet Program, versão 5.0, 1997.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Experimento 1: Efeito da suplementação do meio de MIV e CIV com ITS na produção *in vitro* de embriões bovinos

A presença de ITS durante a MIV, o CIV ou todo o cultivo não afetou o desenvolvimento embrionário, não havendo diferença ( $P>0,05$ ) nas taxas de clivagem e produção de blastocisto em D6 e D7 entre os grupos (Tabela 1).

**Tabela 1:** Efeito da presença da insulina-transferrina-selênio (ITS) no meio de maturação *in vitro* por 24 horas (ITS-MIV), no meio de cultivo *in vitro* (ITS-CIV) ou em ambos (ITS-MIV+ITS-CIV) sobre o desenvolvimento embrionário.

Tratamento	N ovócitos	Desenvolvimento embrionário		
		Clivagem N (%)	Blastocisto D6 N (%)	Blastocisto D7 N (%)
Controle	389	327 (84,0)	129 (33,2)	149 (38,3)
ITS-MIV	392	321 (81,9)	114 (29,1)	130 (33,2)
ITS-MIV+ITS-CIV	383	329 (85,9)	112 (29,2)	136 (35,5)
ITS-CIV	385	316 (82,1)	106 (27,5)	135 (35,1)

Dados avaliados pelo teste do Qui-Quadrado ( $P<0,05$ ).

Com relação a qualidade dos embriões avaliada pela velocidade de desenvolvimento e número total de células, os resultados mostraram que esses parâmetros também não foram afetados pela presença do ITS. Em todos os grupos a maioria dos blastocistos em D7 apresentavam diâmetro  $\geq 160\mu\text{m}$ , indicando estarem mais desenvolvidos (Tabela 2). Da mesma forma, quando embriões de mesmo

tamanho foram comparados, a média do número de células foi semelhante ( $P>0,05$ ) entre os grupos (Tabela 3).

**Tabela 2:** Efeito da presença da insulina-transferrina-selênio (ITS) no meio de maturação in vitro por 24 horas (ITS-MIV), no meio de cultivo in vitro (ITS-CIV) ou em ambos (ITS-MIV+ITS-CIV) sobre o tamanho de embriões em D7 de cultivo.

Tratamento	N embriões	Número de blastocistos D7 de acordo com o tamanho (%)		
		120-140 $\mu$ m N (%)	140-160 $\mu$ m N (%)	$\geq 160\mu$ m N (%)
Controle	149	7 (4,7) <sup>a</sup>	29 (19,5) <sup>a</sup>	113 (75,8) <sup>a</sup>
ITS-MIV	130	1 (0,8) <sup>b</sup>	33 (25,4) <sup>a</sup>	96 (73,8) <sup>a</sup>
ITS-MIV+ITS-CIV	136	4 (2,9) <sup>a,b</sup>	37 (27,2) <sup>a</sup>	95 (69,9) <sup>a</sup>
ITS-CIV	135	5 (3,7) <sup>a,b</sup>	34 (25,2) <sup>a</sup>	96 (71,1) <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa para  $P<0,05$ .

**Tabela 3:** Efeito da presença da insulina-transferrina-selênio (ITS) no meio de maturação in vitro por 24 horas (ITS-MIV), no meio de cultivo in vitro (ITS-CIV) ou em ambos (ITS-MIV+ITS-CIV) sobre o número de células de embriões  $\geq 160\mu$ m em D7 de cultivo.

Tratamento	N embriões	Média do número de células $\pm$ dp
Controle	71	117,9 $\pm$ 25,5
ITS-MIV	64	111,3 $\pm$ 20,7
ITS-MIV+ITS-CIV	66	114,5 $\pm$ 25,6
ITS-CIV	56	115,6 $\pm$ 23,6

Dados avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P<0,05$ ).

## 6.2. Experimento 2: Efeito da presença de ITS associado ao AA durante a MIV na produção in vitro de embriões bovinos

Ao avaliar a exposição de ovócitos ao ITS associado ao AA por diferentes períodos durante a MIV foi observado que a taxa de clivagem foi semelhante ( $P>0,05$ ) entre todos os tratamentos. Entretanto, um efeito benéfico da presença de ITS associado ao AA na taxa de blastocisto foi observado quando os ovócitos foram expostos nas 12 horas finais de maturação (Tabela 4).

**Tabela 4:** Efeito da insulina-transferrina-selênio (ITS) e L-ácido ascórbico (AA) durante as 12 primeiras horas (ITS+AA-1ª12hMIV), as 12 últimas horas (ITS+AA-2ª12hMIV) e as 24 horas (ITS+AA-24hMIV) de maturação in vitro, sobre o desenvolvimento embrionário.

Tratamento	N ovócitos	Desenvolvimento embrionário		
		Clivagem N (%)	Blastocisto D6 N (%)	Blastocisto D7 N (%)
Controle	220	182 (82,7) <sup>a</sup>	85 (38,6) <sup>a,b</sup>	87 (39,5) <sup>a</sup>
ITS+AA-1ª12hMIV	224	181 (80,8) <sup>a</sup>	77 (34,4) <sup>a</sup>	90 (40,2) <sup>a</sup>
ITS+AA-2ª12hMIV	213	181 (85,0) <sup>a</sup>	93 (43,6) <sup>b</sup>	110 (51,6) <sup>b</sup>
ITS+AA-24hMIV	209	167 (79,9) <sup>a</sup>	75 (35,9) <sup>a,b</sup>	86 (41,1) <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa para  $P<0,05$ .

Dados da qualidade dos embriões avaliada pela velocidade de desenvolvimento e número total de células mostraram que no grupo ITS+AA-2ª12hMIV uma maior porcentagem de embriões se desenvolveram mais rapidamente do que nos demais grupos tratados (Tabela 5). Entretanto, a porcentagem de embriões com tamanho

maior do que 160µm foi semelhante a do controle. O número total de células nos embriões maiores também foi semelhante ( $P>0,05$ ) entre o grupo exposto ao ITS e AA durante as últimas 12 horas de maturação e o grupo controle (Tabela 6). Em contraste, o grupo exposto a essas substâncias somente nas primeiras horas apresentou não só menor taxa de embriões em D7, mas também menor desenvolvimento e menor número de células do que o grupo exposto ao ITS e AA nas 12 últimas horas de maturação (Tabela 6).

**Tabela 5:** Efeito da insulina-transferrina-selênio (ITS) e L-ácido ascórbico (AA) durante as 12 primeiras horas (ITS+AA-1ª12hMIV), as 12 últimas horas (ITS+AA-2ª12hMIV) e as 24 horas (ITS+AA-24hMIV) de maturação in vitro sobre o tamanho de embriões em D7 de cultivo.

Tratamento	N embriões	Número de blastocisto em D7 de acordo com o tamanho (%)		
		120-140µm	140-160µm	≥ 160µm
		N (%)	N (%)	N (%)
Controle	87	0 (0) <sup>a</sup>	22 (25,3) <sup>a,b</sup>	65 (74,7) <sup>a,b</sup>
ITS+AA-1ª12hMIV	90	0 (0) <sup>a</sup>	28 (31,1) <sup>a</sup>	62 (68,9) <sup>a</sup>
ITS+AA-2ª12hMIV	110	0 (0) <sup>a</sup>	18 (16,3) <sup>b</sup>	92 (83,7) <sup>b</sup>
ITS+AA-24hMIV	86	0 (0) <sup>a</sup>	25 (29,0) <sup>a</sup>	61 (71,0) <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa para  $P<0,05$ .

**Tabela 6:** Efeito da insulina-transferrina-selênio (ITS) e L-ácido ascórbico (AA) durante as 12 primeiras horas (ITS+AA-1ª12hMIV), as 12 últimas horas (ITS+AA-2ª12hMIV) e as 24 horas (ITS+AA-24hMIV) de maturação in vitro sobre o número de células de embriões  $\geq 160\mu\text{m}$  em D7 de cultivo.

Tratamento	N embriões	Média nº de células $\pm$ dp
Controle	62	131,9 $\pm$ 44,7 <sup>a,b</sup>
ITS+AA-1ª12hMIV	61	122,3 $\pm$ 46,1 <sup>a</sup>
ITS+AA-2ª12hMIV	74	143,2 $\pm$ 49,9 <sup>b</sup>
ITS+AA-24hMIV	56	124,3 $\pm$ 35,3 <sup>a,b</sup>

<sup>a,b</sup> Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa para  $P < 0,05$ .

### 6.3. Experimento 3: Avaliação da cinética de maturação nuclear de ovócitos competentes e incompetentes

Considerando que uma maior taxa de embriões foi obtida no experimento anterior com o uso de ITS e AA durante a maturação, levantou-se a possibilidade desse sistema ter algum benefício para ovócitos menos competentes submetidos à maturação in vitro. Entretanto, antes de testá-la foi necessário avaliar a cinética da maturação para confirmar que o tempo necessário para completar a meiose in vitro seria semelhante entre os ovócitos de diferentes competências. Essas informações são importantes, considerando que os ovócitos seriam expostos aos tratamentos em diferentes fases da maturação. Para esse estudo os dois grupos de ovócitos foram avaliados quanto ao estágio da meiose em diferentes momentos da maturação, sendo utilizado um total de 726 ovócitos.

Os resultados mostraram que em 0 hora de maturação uma maior porcentagem ( $P < 0,05$ ) de ovócitos provenientes de folículos de 6-8mm encontravam-

se em VG quando comparado aos demais grupos. Entretanto, em todos os grupos mais de 90% dos ovócitos encontrava-se em VG. Também foi observado às 8 horas de cultivo que no grupo controle a meiose estava mais avançada, pois apresentavam uma menor percentagem de ovócitos em VG e uma maior percentagem ( $P<0,05$ ) de ovócitos em VGBD e metáfase I (Tabela 7) em relação aos outros grupos. Entretanto, os grupos de ovócitos obtidos de folículos dissecados não diferiram quanto aos estágios da meiose mesmo tendo diferentes graus de competências. Às 24 horas de maturação todos os ovócitos, independente do grupo, tinham completado a meiose sendo que em torno de 90% encontrava-se em estágio de MII.

**Tabela 7:** Cinética da maturação nuclear em ovócitos controle provenientes de folículos de 3-8mm obtidos por aspiração folicular e ovócitos obtidos de folículos de 1-3mm e de folículos de 6-8mm dissecados individualmente da córtex ovariana.

Grupos	N ovócitos	Estágio da meiose						
		VG (%)	VGBD (%)	MI (%)	AI (%)	TI (%)	MII (%)	Anormal (%)
Controle 0h	101	94 (93,06) <sup>a</sup>	6 (5,94) <sup>a</sup>	1 (1,0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>
1-3 mm 0h	60	55 (91,66) <sup>a</sup>	4 (6,66) <sup>a</sup>	1 (1,66) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>
6-8 mm 0h	98	98 (100) <sup>b</sup>	0 (0) <sup>b</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>
Controle 8hs	103	3 (2,91) <sup>a</sup>	48 (46,60) <sup>a</sup>	52 (50,48) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>
1-3 mm 8hs	63	9 (14,28) <sup>b</sup>	41 (65,07) <sup>b</sup>	13 (20,63) <sup>b</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>
6-8 mm 8hs	89	15 (16,85) <sup>b</sup>	64 (71,91) <sup>b</sup>	10 (11,23) <sup>b</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>
Controle 24hs	70	0 (0) <sup>a</sup>	1 (1,42) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	1 (1,42) <sup>a</sup>	1 (1,42) <sup>a</sup>	64 (91,42) <sup>a</sup>	3 (4,28) <sup>a,b</sup>
1-3 mm 24hs	75	0 (0) <sup>a</sup>	1 (1,33) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	2 (2,66) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	67 (89,33) <sup>a</sup>	5 (6,66) <sup>b</sup>
6-8 mm 24hs	67	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	3 (4,47) <sup>a</sup>	3 (4,47) <sup>a</sup>	61(91,04) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa para  $P<0,05$ .

**6.4. Experimento 4: Efeito da presença de ITS associado ao AA durante às 12 últimas horas da MIV na capacidade de desenvolvimento de ovócitos provenientes de folículos pequenos**

Considerando que a exposição de ovócitos ao ITS associado ao AA durante às 12 últimas horas da MIV melhora a quantidade e qualidade de embriões PIV, foi levantada a hipótese de que essa alteração na maturação poderia também melhorar a capacidade de desenvolvimento de ovócitos provenientes de folículos pequenos que não são capazes de formar embriões. Os resultados obtidos mostraram que, independente da adição de ITS e AA na MIV de ovócitos de folículos pequenos, a taxa de clivagem (48h pi) e a produção de blastocistos nos dias 6 (D6) e 7 (D7) de cultivo foram inferiores quando comparadas as obtidas em ovócitos provenientes de folículos maiores que 3mm (Tabela 8). Não houve diferença ( $P < 0.05$ ) nesses parâmetros entre os grupos de ovócitos provenientes de folículos pequenos. Entretanto, assim como no experimento 2, um efeito benéfico da presença de ITS associado ao AA na taxa de blastocisto foi observado quando ovócitos aspirados de folículos de 3-8mm foram maturados nas 12 últimas horas de MIV na presença dessas substâncias (Tabela 8).

**Tabela 8:** Efeito da insulina-transferrina-selênio (ITS) e L-ácido ascórbico (AA) durante as 12 primeiras horas de maturação in vitro (MIV) em ovócitos provenientes da aspiração de folículos de 3-8mm (ITS+AA 3-8mm) e em ovócitos provenientes de folículos de 1-3mm (ITS+AA 1-3mm) dissecados do ovário sobre o desenvolvimento embrionário.

Tratamento	N ovócitos	Desenvolvimento embrionário		
		Clivagem N (%)	Blastocisto D6 N (%)	Blastocisto D7 N (%)
Controle 3-8mm	143	128 (89.5) <sup>a</sup>	52 (36,4) <sup>a</sup>	70 (49,0) <sup>a</sup>
ITS+AA 3-8mm	141	130 (92.2) <sup>a</sup>	57 (40,4) <sup>a</sup>	86 (61,0) <sup>b</sup>
Controle 1-3mm	45	22 (49.9) <sup>b</sup>	1 (2,2) <sup>b</sup>	2 (4,4) <sup>c</sup>
ITS+AA 1-3mm	47	24 (51,0) <sup>b</sup>	6 (12,8) <sup>b</sup>	7 (14,9) <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup> Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa para  $P < 0,05$ .

Os resultados da qualidade dos embriões avaliada pela velocidade de desenvolvimento e número total de células mostraram que o grupo ITS+AA 3-8mm apresentou uma maior porcentagem ( $P < 0,05$ ) de embriões que se desenvolveram mais rapidamente quando comparado com os demais grupos, pois apresentavam maior tamanho ( $P < 0,05$ ) em D7, (Tabela 9). No tocante ao número total de células dos embriões maiores, houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os grupos de ovócitos aspirados de folículos de 3-8mm, sendo que os expostos ao ITS e AA durante as últimas horas de maturação apresentaram maior número do que os que não foram expostos (Tabela 10). Em relação aos ovócitos provenientes de folículos pequenos, a produção

de embriões foi muito baixa não possibilitando uma avaliação dos dados já que estes não apresentavam número suficiente.

**Tabela 9:** Efeito da insulina-transferrina-selênio (ITS) e L-ácido ascórbico (AA) durante as 12 primeiras horas de maturação in vitro em ovócitos aspirados de folículos de 3-8mm (ITS+AA 3-8mm) e em ovócitos provenientes de folículos de 1-3mm (ITS+AA 1-3mm) dissecados sobre o tamanho de embriões em D7 de cultivo.

Tratamento	N embriões	Número de blastocisto em D7 de acordo com o tamanho (%)		
		120-140µm (%)	140-160µm (%)	≥ 160µm (%)
Controle 3-8mm	70	0 (0) <sup>a</sup>	20 (28,6) <sup>a</sup>	50 (71,4) <sup>a</sup>
ITS+AA 3-8mm	86	0 (0) <sup>a</sup>	8 (9,3) <sup>b</sup>	78 (90,7) <sup>b</sup>
Controle 1-3mm	2	0 (0) <sup>a</sup>	2 (100) <sup>c</sup>	0 (0) <sup>c</sup>
ITS+AA 1-3mm	7	0 (0) <sup>a</sup>	3 (42,9) <sup>a</sup>	4 (57,1) <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup> Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa para P<0,05.

**Tabela 10:** Efeito da insulina-transferrina-selênio (ITS) e L-ácido ascórbico (AA) durante as 12 primeiras horas de maturação in vitro em ovócitos provenientes de folículos de 3-8mm (ITS+AA 3-8mm) e em ovócitos provenientes de folículos de 1-3mm (ITS+AA 1-3mm) sobre o número de células de embriões ≥160µm em D7 de cultivo.

Tratamento	N embriões	Média nº de células ± dp
Controle 3-8mm	50	133,8 ± 47,2 <sup>a</sup>
ITS+AA 3-8mm	74	172,8 ± 60,1 <sup>b</sup>
Controle 1-3mm	-	-
ITS+AA 1-3mm	4	107,75 ± 60,6 <sup>a,b</sup>

<sup>a,b</sup> Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa para P<0,05.

## 7. DISCUSSÃO

No presente estudo foi investigada a influência da presença do ITS e AA durante a maturação *in vitro* e/ou cultivo *in vitro*, sobre a produção e qualidade de embriões PIVE. Para isso, foi utilizado como parâmetros de avaliação, o desenvolvimento embrionário até o D7 pós-inseminação, o tamanho e o número total de células dos embriões.

Inicialmente foi avaliada se a presença de ITS durante a MIV, CIV ou todo o cultivo teria algum efeito no desenvolvimento embrionário. Entretanto, os resultados mostraram que a presença do ITS em qualquer etapa da PIVE não afetou a quantidade e a qualidade dos embriões produzidos. Esses resultados diferem dos obtidos por Jeong et al. (2008 ) que avaliando a adição de ITS na MIV de ovócitos de suínos, relataram uma melhora na concentração de glutatona ovocitária e, conseqüentemente no desenvolvimento embrionário. Da mesma forma, outro estudo em suínos também demonstrou que o uso de ITS melhorou as taxas de maturação nuclear e citoplasmática (Hu et al., 2011).

A diferença nos resultados do presente estudo e dos trabalhos citados anteriormente poderia ser explicada pelo tempo de maturação de ovócitos de suínos que é o dobro quando comparado com a de ovócitos de bovinos (Hafez, 2003), esse prolongamento pode levar ao maior acúmulo de radicais livres e de outras substâncias prejudiciais, fazendo com que a ação do ITS seja mais evidente.

Outro fator que pode ser responsável pelas diferenças observadas entre os estudos é que no presente trabalho foi utilizado como fonte proteica no meio de MIV o SFB, substância de composição indefinida, que contém hormônios, fatores de crescimento, vitaminas, quelantes para metais pesados, peptídeos, proteínas, ácidos

graxos, glicídios, entre outros componentes (Keskinetepe e Brackett, 1996; Gonçalves et al., 2002). Em contraste com os outros trabalhos citados anteriormente que utilizaram o PVA, que é uma macromolécula bem definida. Portanto, é bem possível que a indefinição do meio suplementado com SFB, que apresenta substâncias que mimetizam a ação do ITS (Keskinetepe e Brackett, 1996; Gonçalves et al., 2002), possa ter mascarado seus efeitos sendo responsável pela semelhança dos resultados encontrados entre os grupos estudados.

A combinação de insulina–transferrina–selenium (ITS) tem sido utilizada para melhorar as condições de maturação em várias espécies. A insulina induz a captação de glicose e possui atividade mitogênica e anti-apoptótica (Augustin *et al.*, 2001). A presença de receptores de insulina tem sido demonstrada em ovócitos competentes e incompetentes (Acevedo et al., 2007), e seu efeito positivo no potencial de desenvolvimento de ovócitos bovinos e suínos tem sido demonstrado. Já a transferrina e o selênio são elementos essenciais para vários processos fisiológicos e possuem ação antioxidante. E, apesar do ITS ser o suplemento de eleição para o crescimento e maturação de ovócitos em meios definidos ou semi-definidos, o seu uso na presença de soro e na maturação de ovócitos menos competentes ainda não foi relatada.

Alguns estudos relatam que a associação de ITS e L-ácido ascórbico, que é o mais importante antioxidante hidrossolúvel presente no ovário, durante a maturação tem ação benéfica na capacidade de desenvolvimento dos ovócitos. Portanto, no experimento 2 foi avaliado a suplementação de ITS associado com o AA por diferentes períodos durante a maturação.

Os resultados mostraram um efeito benéfico na taxa de blastocisto quando os ovócitos foram expostos ao ITS associado ao AA nas 12 horas finais de MIV. Já na qualidade embrionária, avaliada pelo tamanho e número de células em D7 nenhuma diferença foi evidenciada entre os grupos. O efeito desses componentes (ITS e AA) individualmente já foi avaliado por inúmeros autores (Dalvit et al. 2005; Jeong et al. 2008; Rossetto et al. 2009; Tao et al. 2010; Hu et al. 2011; Melo et al. 2011; Kere et al. 2013). Entretanto, estudos com a utilização de ITS e AA conjuntamente, como é o caso deste experimento, são escassos. A associação dessas duas substâncias já foi utilizada na MIV de ovócitos de bezerras pré-púbere com aumento na capacidade de desenvolvimento desses ovócitos (Córdova et al. 2010). A adição dessas substâncias e um baixo nível de hormônios durante as 12 primeiras horas de MIV de ovócitos de cabra pré-púbere mantiveram a qualidade intrínseca dos blastocistos produzidos, aumentando assim a sua sobrevivência durante o processo de criopreservação, porém não houve acréscimo na quantidade de blastocistos produzidos (Hammami et al., 2012). Apesar de o presente estudo ter mostrado resultados semelhantes, ou seja, a presença de ITS e AA durante a maturação tem efeito benéfico na PIVE, o período da maturação afetado pela suplementação foi diferente.

No presente estudo os melhores resultados referentes ao desenvolvimento embrionário foram encontrados no grupo com adição de ITS e AA na segunda parte da maturação. É possível que uma concentração de radicais livres e substâncias prejudiciais aos ovócitos estejam presentes nas últimas horas de MIV quando comparado com as primeiras horas. Desta forma, a ação do ITS e AA pode ter sido mais efetiva na redução dos efeitos deletérios de substâncias que se acumularam durante

as 12 primeiras horas de MIV, o que seria responsável pelo melhor resultado obtido nesse grupo.

A utilização de AA durante as 24 horas de maturação em ovócitos de bovinos foi prejudicial para o desenvolvimento embrionário subsequente (Córdova et al. 2010), sugerindo que essa substância na concentração de 100µg/ml, a mesma usada no presente estudo, utilizada por um longo tempo pode ser tóxica para os ovócitos. Entretanto, esse efeito prejudicial não foi observado no presente estudo quando se utilizaram ITS e AA durante as 24 horas de MIV. Esses resultados estão de acordo com os resultados descritos por Dalvit et al. (2005), em que a suplementação do meio de maturação, com ácido ascórbico durante 22h, não alterou a percentagem de blastocistos bovinos produzidos in vitro em relação ao grupo de controle.

Considerando que a utilização conjunta de ITS e AA durante a maturação melhorou a taxa de embriões em estudos utilizando ovócitos de animais pré-púbere, levantou-se a hipótese de que esse sistema poderia ser benéfico para a maturação in vitro de ovócitos pouco competentes, obtidos de folículos pequenos. Para testar essa hipótese foi utilizado o modelo do tamanho de folículo já bem caracterizado em estudos de competência ovocitária (Dode et al., 2006; Caixeta et al., 2009; Racedo et al., 2009; Bessa, et al. 2013).

Entretanto, como no sistema a ser testado, a exposição à suplementação de ITS e AA seria apenas em um período da maturação foi necessário confirmar se a cinética da maturação é semelhante entre as duas categorias de ovócitos. Os resultados mostraram que em 0 hora de maturação houve uma maior porcentagem de ovócitos provenientes de folículos de 6-8mm em VG em relação aos demais grupos. Apesar da

diferença estatística, essa tem pouca significância biológica, uma vez que todos os grupos apresentaram taxas de VG maiores que 90%, o que condiz com outros achados da literatura (Dode et al. 2000; Guimarães, 2013).

Além disso, foi observado que às 8 horas de maturação o grupo controle estava mais avançando na meiose do que os demais grupos com uma maior porcentagem de ovócitos em metáfase I. Entretanto, os grupos de ovócitos obtidos de folículos dissecados não diferiram às 8 horas, quanto aos estágios da meiose mesmo tendo diferentes graus de competências. Essa diferença na cinética pode ser devido ao método de coleta utilizado, uma vez que os ovócitos do grupo controle foram aspirados dos folículos e, portanto permaneceram mais tempo fora do ambiente folicular antes de serem colocados para maturar, enquanto os dos demais grupos foram obtidos de folículos dissecados e foram colocados na maturação imediatamente após serem liberados de seus folículos. Mas de qualquer forma, essa diferença não prejudicou o desenvolvimento meiótico, pois às 24 horas de maturação todos os grupos apresentaram a maioria dos ovócitos em metáfase II.

Um dos grandes problemas no desenvolvimento do experimento 3 foi a obtenção do material biológico, isso porque os ovócitos foram obtidos de folículos que foram dissecados individualmente dos ovários. A dissecação e posterior mensuração dos folículos era uma tarefa trabalhosa e demorada, o que limitava o número de ovócitos obtidos em cada dia de manipulação, pois o tempo não devia ultrapassar o previamente estabelecido para que as amostras não fossem afetadas. Além da dificuldade com relação ao tempo, observamos durante o estabelecimento da técnica

de coleta que dos folículos pequenos 50% dos ovócitos eram viáveis e puderam ser utilizados, já os dos folículos grandes em torno de 75% eram viáveis.

A avaliação do efeito da presença de ITS associado ao AA durante as 12 últimas horas da MIV confirmaram o efeito benéfico da presença de ITS associado ao AA nas 12 últimas horas de MIV na taxa de blastocisto e qualidade dos embriões, quando ovócitos aspirados de folículos de 3-8mm foram utilizados.

Quando ovócitos provenientes de folículos de 1-3mm foram utilizados não houve efeito benéfico do uso de ITS e AA durante a maturação sobre a competência ovocitária discordando dos encontrados por Córdova et al. (2010) e Hammami et al. (2012). Esses trabalhos utilizaram como modelo experimental fêmeas pré-púbere nas quais apesar da maioria dos ovócitos nesta fase de desenvolvimento apresentar menor grau de competência, alguns já atingiram a competência ovocitária (Palma et al. 1993; Revel et al. 1995).

Em contraste, o modelo experimental para separar ovócitos de graus de competência distintos empregado neste trabalho, garante a similaridade do material biológico considerando que usa um tamanho definido de folículos que são dissecados do tecido ovariano (Caixeta et al., 2009; Bessa et al. 2013). Esse fato poderia aumentar a probabilidade de que os ovócitos usados neste estudo pudessem ser menos competentes do que os utilizados por Córdova et al. (2010) e Hammami et al. (2012) em suas pesquisas. Portanto a melhor taxa de blastocistos encontrada por esses autores pode ser devido à presença de ovócitos mais competentes do que aqueles empreendidos no presente estudo.

Além disso, a competência ovocitária está diretamente relacionada com o acúmulo de transcritos e proteínas no ovócito antes deste retomar a meiose e completar a maturação (Dode et al., 2006; Caixeta et al., 2009; Racedo et al., 2009; Bessa et al. 2013). Portanto, a ação de substâncias como o ITS e AA, que atuam principalmente sobre a produção de radicais livres e produtos indesejáveis no ovócito e no meio de maturação (Tilly et al., 1995; Eppig et al. 2000; Murray et al., 2001; Kim, et al. 2005; Lee, et al. 2005), pode não ter sido suficiente para uma melhora da competência, porquanto essa interferência não foi a nível molecular. Não descartando, de qualquer forma, a importância desses agentes como suporte mediante alguns ovócitos que possuíssem o mínimo de condições para o subsequente desenvolvimento embrionário, o que explicaria, mesmo que não significativa à melhora observada no desenvolvimento embrionário de ovócitos tratados com ITS e AA durante a MIV.

Outra diferença que pode ser ressaltada entre este experimento e os estudos conduzidos por Córdova et al. (2010) e Hammami et al. (2012), é que na presente pesquisa não foi avaliada, utilizando ovócitos menos competentes, a adição de ITS e AA nas 12 primeiras horas de maturação, onde os outros autores anteriormente citados encontraram maior eficiência no uso dessas substâncias.

Apesar de esse estudo ter mostrado resultados benéficos para o desenvolvimento embrionário e a qualidade dos embriões, utilizando a associação de ITS e AA durante as 12 últimas horas de maturação in vitro, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos responsáveis por esse efeito. Portanto, outras avaliações tais como a concentração de GSH, a presença de radicais livres no

meio, e a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo, poderiam dar suporte à hipótese de que o efeito benéfico seria devido à redução de substâncias indesejáveis para o cultivo in vitro. Essas informações seriam importantes para que novos horários e períodos de tempo, dentro dessa janela das 12 últimas horas da maturação, sejam testados para que o uso desse procedimento possa ser mais facilmente introduzido na rotina da PIV. Além disso, estudos adicionais também devem ser feitos avaliando essa suplementação nas primeiras horas de MIV em ovócitos menos competentes obtidos de folículos pequenos para que se possa confirmar que a mesma não afeta a capacidade de desenvolvimento desses ovócitos.

## **8. CONCLUSÃO**

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, conclui-se que somente a adição de ITS na MIV e/ou CIV não foi suficiente para melhorar a quantidade e qualidade de embriões PIVE. No entanto, quando essa substância foi associada ao AA nas 12 últimas horas de maturação houve um acréscimo no desenvolvimento embrionário e um aumento no tamanho e na média do número total de células dos embriões produzidos. Além disso, não foi observado esse efeito quando foram utilizados nas mesmas condições ovócitos menos competentes provenientes de folículos pequenos.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, N., DING, J.; SMITH, G. Insulin signaling in mouse oocytes. **Biology of Reproduction**, v.77, p.872-879, 2007.

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.

AUGUSTIN, R.; POCAR, P.; NAVARRETE-SANTOS, A.; WRENZYCKI, C.; GANDOLFI, F.; NIEMANN, H.; FISCHER, B. Glucose transporter expression is developmentally regulated in *in vitro* derived bovine preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.60, p.370–376, 2001.

BANWELL, K. M., LANE, M., RUSSELL, D. L., KIND, K. L., THOMPSON, J. G. Oxygen concentration during mouse oocyte maturation affects embryo and fetal development. **Human Reproduction**, v.22, p.2768-2775, 2007.

BARNES, D.; SATO, G. Methods for growth of cultured cells in serum medium. **Analytical Biochemistry**, v.102, p.255-270, 1980.

BESSA I.; NISHIMURA R.; FRANCO M.; DODE, M. Transcription profile of candidate genes for the acquisition of competence during oocyte growth in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v.11, p. 1-9, 2013.

BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.41, p.54-62, 1995.

CAIXETA E. S.; DODE M. A. N. Dissecação folicular: Um método eficiente para estudos de competência ovocitária. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. 2008.

CAIXETA, E. S.; RIPAMONTE, P.; FRANCO, M. M.; JUNIOR, J. B.; DODE, M. A. N. Effect of follicle size on mRNA expression un cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*:an approach to identify markers genes for developmental competence. **Reproduction Fertility and Development**, v.21, p.655-664, 2009.

CAIXETA, S. E.; DODE, N. A. M. Avaliações da competência ovocitária em bovinos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 17, p.8-18, 2010.

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

CHAIGNE, A.; VERLHAC, M.; TERRET, M. Spindle positioning in mammalian oocytes. **Experimental Cell Research**, p.6, 2012.

CHUI, D. K., PUGH, N. D., WALKER, S. M., GREGORY, L., SHAW, R. W. Follicular vascularity the predictive value of transvaginal power Doppler ultrasonography in an *in vitro* fertilization programme: a preliminary study. **Human Reproduction**, v.12, p.191-196, 1997.

CHWA, M.; ATILANO, S. R.; REDDY, V.; JORDAN, N.; KIM, D. W.; KENNEY, M. C. Increased stress-induced generation of reactive oxygen species and apoptosis in human keratoconus fibroblasts. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.47, p.1902–1910, 2006.

CORDOVA, B.; MORATO, 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.

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

DAS, C. Z.; GUPTA, K. M.; UHM, J. S.; LEE, T. H. Supplementation of insulin–transferrin–selenium to embryo culture medium improves the *in vitro* development of pig embryos. **Zygote**, v.10, p.1-8, 2013.

DE MATOS, C. C.; FURNUS, C. C. The importance of having high glutathione (GSH) levels after bovine in vitro maturation on embryo development: effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cysteine. **Theriogenology**, v. 53, p.761-771, 2000.

DELEUZE, S.; GOUDET, G. Cysteamine supplementation of in vitro maturation media: a review. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.476-482, 2010.

DODE, M. A. N.; DUFORT, I.; MASSICOTTE, L.; SIRARD, M. A. Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.288-297, 2006.

DODE, M. A. N.; RODOVALHO, N. C.; UENO, V. G.; ALVES, R. G. O. Efeitos do tamanho do folículo na maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos de fêmeas zebuínas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 207-214, 2000.

DOMINKO, T.; FIRST, N. L. Kinetics of bovine oocyte maturation allows selection for developmental competence and its affected by gonadotropins. **Theriogenology**, v.37, p.203, 1992.

EBERT, R.; ULMER, M.; ZECK, S.; MEISSNER-WEIGL, J.; SCHNEIDER, D.; STOPPER, H.; SCHUPP, N.; KASSEM, M.; JAKOB F. Selenium supplementation restores the antioxidative capacity and prevents cell damage in bone marrow stromal cells in vitro. **Stem Cells**, v. 24, p.1226-1235, 2006.

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.

EKBLOM, P. Basement membrane proteins and growth factors in kidney differentiation. In: Trelstad, RL, The role of extracellular matrix in development. **Liss A.R**, New York, p.173-206, 1984.

EPPIG, J. J.; HOSOE, M.; O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, F. M.; REQUENA, A.; WATANABE, S. Conditions that affect acquisition of developmental competence by mouse oocytes in vitro: FSH, insulin, glucose and ascorbic acid. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.163, p.109-116, 2000.

EYESTONE, W. H.; BOER, H. A. FSH enhances developmental potential of bovine oocytes matured in chemically defined medium. **Theriogenology**, v.39, p.216, 1993.

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**, v.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**, v.71, p.836-848, 2009.

GARCIA, J. M.; COELHO, L. A.; ESPER, C. R. O uso de PMSG/ HCG na maturação *in vitro* de oócitos bovinos fecundados *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1995, Belo Horizonte. **Anais** Belo Horizonte: 1995. p. 403.

GONÇALVES, P.; VISINTIN, J.; OLIVEIRA, M.; DE MONTAGNER, M.; COSTA, L. D. Produção de Embriões *in vitro*. In: GONÇALVES, P.; FIGUEIREDO, J. D.; FREITAS, V. D. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, (p. 195-226). São Paulo, SP, Brasil: Varela, 2002.

GRONBAEK, H.; FRYSTYK, J.; ORSKOV, H.; FLYVBJERG, A. Effect of sodium selenite on growth, insulin-like growth factor binding proteins and insulin-like growth factor in rats. *Journal of Andrology*, v.145, p.105-112, 1995.

GUIMARÃES, A. L. S. **Avaliação de diferentes sistemas de maturação para aumentar a competência de ovócitos bovinos. 2013.** 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília/DF, 2013.

GULER, A.; POULIN, N.; MERMILLOD, M. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. **Theriogenology**, v.54, p.209-218, 2000.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7.ed. Ed. Monole: São Paulo, 2004.

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 oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. **Molecular Reproduction and Development**, v.53, p.451-458, 1999.

HAMMAMI, S.; MORATO, R.; ROMAGUERA, R.; ROURA, M.; CATALA, M. G.; PARAMIO, M. T.; MOGAS, T.; IZQUIERDO, D. Developmental competence and embryo quality of small oocytes from pre-pubertal goats cultured in ivm medium supplemented with low level of hormones, insulin–transferrin–selenium and ascorbic acid. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, p.339–344, 2013.

HARVEY, A. J. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.113-128, 2007.

HASHIMOTO, S.; MINAMI, N.; TAKAKURA, R. Low oxygen tension during *in vitro* maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine

*cumulus*-oocyte complexes. **Molecular Reproduction and Development**. v. 57, p. 353-360, 2000.

HASLER, J. F. In vitro culture of bovine embryos in Ménézo's B2 medium with or coculture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. **Animal Reproduction Science**, vs.60-61, p.81-91, 2000.

HERRLER, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Effects of insulinlike growth factor-I on *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**, v.37, p.1213-1224, 1992.

HOLM, P.; BOOTH, P. J.; SCHIMIDT, M. H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum proteins. **Theriogenology**, v.52, p.683–700, 1999.

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.

JEONG, Y. W.; HOSSEIN, M. S.; BHANDARI, D. P.; KIM, Y. W.; KIM, J. H.; PARK, S. W.; LEE, E.; PARK, S. M.; JEONG, Y. I.; LEE, J. Y.; KIM, S.; HWANG, W. S. Effects of insulin–transferrin–selenium in defined and porcine follicular fluid supplemented IVM media on porcine IVF and SCNT embryo production. **Animal Reproduction Science**, v.106, p.13–24, 2008.

KERE, M.; SIRIBOON, C.; LO, N.; NGUYEN, T. N.; JU, J. Ascorbic acid improves the developmental competence of porcine oocytes after parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transplantation. **Journal of Reproduction and Development**, v.59, p.78-84, 2013.

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

KIKUCHI, K.; ONISHI, A.; KASHIWAZAKI, N.; IWAMOTO, M.; NOGUCHI, J.; KANETTO, H.; AKITA, T.; NAGAI, T. Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified in vitro system. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1033-1041, 2002.

KIM, H. S.; LEE, G. S.; KIM, J. H.; KANG, S. K.; LEE, B. C.; HWANG, W. S. Expression of leptin ligand and receptor and effect of exogenous leptin supplement on *in vitro* development of porcine embryos. **Theriogenology**, v.65, p.831–844, 2006.

KIM, S.; LEE, G. S.; LEE, S. H.; KIM, H. S.; JEONG, Y. W.; KIM, J. H.; KANG, S. K.; LEE, B. C.; HWANG, W. S. Embryotropic effect of insulin-like growth factor (IGF)-I and its receptor on development of porcine preimplantation embryos produced by in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. **Molecular Reproduction and Development**, v.72, p.88–97, 2005.

LEE H. J.; TEIXEIRA J. Parthenogenesis in human oocytes that were collected from resected ovarian tissue and matured In Vitro. **Stem Cells and Development**, v.18, p.941-946, 2009.

LEE, M. S.; KANG, S. K.; LEE, B. C.; HWANG, W. S. The beneficial effects of insulin and metformin on in vitro developmental potential of porcine oocytes and embryos. **Biology of Reproduction**, v.73, p.1264–1268, 2005.

LEQUARRE, A. S.; GRISART, B.; MOREAU, B.; SCHUURBIES, N.; MASSIP, A.; DESSY, F. Glucose metabolism during bovine preimplantation development: analysis of gene expression in single oocytes and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.48, p.216-226, 1997.

LODDE, V.; MODINA, S. C.; FRANCIOSI, F.; ZUCCARI, E.; TESSARO, I.; LUCIANO, A. M. Localization of DNA methyltransferase-1 during oocyte differentiation, in vitro

maturation and early embryonic development in cow. **European Journal of Histochemistry**, v.53, p.199-208, 2009.

LONERGAN, P., MONAGHAN, P., RIZOS, D., BOLAND, M. P., GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following oocyte maturation, fertilization and culture in vitro. **Molecular and Reproduction Development**, v.37, p.48-53, 1994.

MACHADO, G. M.; CARVALHO, J. O.; SIQUEIRA FILHO, E.; CAIXETA, E. S.; FRANCO, M. M.; RUMPF, R.; DODE, M. A. N. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v.71, 1289–1297, 2009.

MACHATKOVA, M.; KRAUSOVA, K.; JOKESOVA, E.; TOMANEK, M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. **Theriogenology**, v.61, p.329-335, 2004.

MASTROMONACO, G.; SEMPLE, E.; ROBERT, C.; RHO, G.; BETTS, D.; KING, W. Different culture media requirements of IVF and nuclear transfer bovine embryos. **Reproduction in Domestic Animal**, v.39, p.462-467, 2004.

MELO, M. A. P.; OSKAM, I. C.; CELESTINO, J. J. H.; CARVALHO, A. A.; CASTRO, S. V.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; SANTOS, R. R. Adding ascorbic acid to

vitrification and IVC medium influences preantral follicle morphology, but not viability. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p.742–745, 2011.

MERMILLOD, P.; TOMANEK, M.; MARCHAL, R.; MEIJER, L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. **Molecular Reproduction and Development**, v.55, p.89-95, 2000.

MERTON, J. S.; KNIJN, H. M.; FLAPPER, H.; DOTINGA, F.; ROELEN, B. A. J.; VOS, P. L. A. M.; MULLAART, E. Cysteamine supplementation during in vitro maturation of slaughterhouse- and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf characteristics. **Theriogenology**, v. 71, p.1–7, 2013.

MOUROT, M.; DUFORT, I.; GRAVEL, C.; ALGRIANY, O.; DIELEMAN, S.; SIRARD, M.A. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.1367-1379, 2006.

MURRAY, A. A.; MOLINEK, M. D.; BAKER, S. J.; KOJIMA, F. N.; SMITH, M. F.; HILLIER, S. G.; SPEARS, N. Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles in vitro. **Reproduction**, v.121, p.89-96, 2001.

NAGAI, T. The improvement of *in vitro* maturation system for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, v.55, p.1291-1301, 2001.

NAM, D. H.; LEE, S. H.; KIM, H. S.; LEE, G. S.; JEONG, Y. W.; KIM, S.; KIM, J. H.; KANG, S. K.; LEE, B. C.; HWANG, W. S. The role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its receptor in development of porcine preimplantation embryos derived from *in vitro* fertilization. **Theriogenology**, v.63, p.190–201, 2005.

NGUYEN, N. T.; LO, N. W.; CHUANG, S. P.; JIAN, Y. L.; JU, J. C. Sonic hedgehog supplementation of oocyte and embryo culture media enhances development of IVF porcine embryos. **Reproduction**, v.142, p.87–97, 2011.

NOWAK-IMIALEK M.; WRENZYCKI C.; HERMANN D.; LUCAS-HAHN A.; LAGUTINA I.; LEMME E.; LAZZARI G.; GALLI C.; NIEMANN H. Messenger RNA expression patterns of histone associated genes in bovine preimplantation embryos derived of different origins. **Molecular Reproduction and Development**, v.75, p.731–743, 2008.

OCANA, Q. J. M.; PINEDO, M. M.; ORTEGA, M. M.; MORENO, M. M. Influence of human and bovine insulin on *in vitro* maturation, fertilization and cleavage rates of bovine oocytes. **Archivos de Zootecnia**, v.47, p.85–93, 1998.

OLIVEIRA, A. T.; LOPES, R.; RODRIGUES, J. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced *in vitro* with different serum

concentra- tions. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, p.129-136, 2006.

OLSON, S. E.; SEIDEL, G. E. Vitamin E improves development of bovine embryos produced in vitro. **Theriogenology**, v.43, p.289, 1995.

OYAMADA, T.; FUKUI, Y. Oxygen tension and medium supplements for in vitro maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. **Journal of Reproduction and Development**, v.50, p.107-117, 2004.

PALMA, G.A.; CLEMENT-SENFELD, A.; KREFFT, H. In vitro production of embryos from calf oocytes. **Theriogenology**, v.39, p.278, 1993.

PARRISH, J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v.44, p.859-869, 1995.

PREIS, K. A., SEIDEL, G. E. J., GARDNER, D.K. Reduced oxygen concentration improves the developmental competence of mouse oocytes following *in vitro* maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p.893-903, 2007.

RACEDO, S. E.; WRENZYCKI, C.; LEPIKHOV, K.; SALAMONE, D.; WALTER, J.; NIEMANN H. Epigenetic modifications and related mRNA expression during bovine oocyte in vitro maturation. **Reproduction Fertility and Development**, v.21, p.738–748, 2009.

REVEL F.; MERMILLOD, P.; PEYNOT, N.; RENARD, J.; HEYMAN, Y. Low developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. **Journal of Reproduction & Fertility**, v.103, p.115-120, 1995.

RIZOS, D.; LONERGAN, P.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implication for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.234-248, 2002.

ROSSETTO, R.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; MARTINS, F. S. FAUSTINO, L. R., ARAÚJO, V. R.; SILVA, C. M. G.; NAME, K. P. O.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; BLUME, H. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term in vitro culture of caprine preantral follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 37, p. 112-123, 2009.

SAIKHUN, K.; FAISAIKARM, T.; MING, Z.; LU, K. H.; KITIYANANT, Y.  $\alpha$ -Tocopherol and ascorbic acid increase the *in vitro* development of IVM/IVF swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **Animal**, v.2, p.1486-1490, 2008.

SANCHEZ F.; ADRIAENSSENS T.; ROMERO S.; SMITZ J. Quantification of oocyte-specific transcripts in follicle-enclosed oocytes during antral development and maturation in vitro. **Molecular Human Reproduction**, v.15, p.539-550, 2009.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**. p.17, 2012.

SIRARD, A. M.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.65, p.126-136, 2006.

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

SOLOVERA, R. M.; ROSALES, S. A. J.; RODRÍGUEZ, B. C. Effect of culture medium on in vitro bovine embryo development. **Veterinaria México**, v.34, p.389-395, 2003.

SONG, J. L.; WESSEL, G. M. How to make an egg: transcriptional regulation in oocytes. **Differentiation**, v.73, p.1-17, 2005.

SPICER, L. J.; ECHTERNKAMP, S. E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. **Domestic Animals Endocrinology**, v.12, p.223-245, 1995.

TAO, Y.; CHEN, H.; TIAN, N. N.; HUO, D. T.; LI, G.; ZHANG, Y. H.; LIU, Y.; FANG, F. G.; DING, J. P.; ZHANG, X. R. Effects of l-ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol and co-culture on in vitro developmental potential of porcine cumulus cells free oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.19–25, 2010.

TATEMOTO, H.; MUTO, N.; SUNAGAWA, I.; SHINJO, A.; NAKADA, T. Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1150-1157, 2004.

TATEMOTO, H.; OOTAKI, K.; SHIGETA, K.; MUTO, N. Enhancement of developmental competence after in vitro fertilization of porcine oocytes by treatment with ascorbic acid 2-O- $\alpha$ -glucoside during in vitro maturation. **Biology of Reproduction**, v.65, p.1800-1806, 2001.

TILLY, J. L.; TILLY, K. I. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. **Endocrinology**, v.136, p.242–252, 1995.

UHM, S. J.; GUPTA, M. K.; YANG, J. H.; CHUNG, H. J.; MIN, T. S.; LEE, H. T. Epidermal growth factor can be used in lieu of follicle-stimulating hormone for nuclear maturation of porcine oocytes in vitro. **Theriogenology**, v.73, p.1024–1036, 2010.

VAN DE LEEMPUT, E. E.; VOS, P. L. A. M.; ZEINSTRA, E. C. Improved in vitro embryo development using in vivo matured oocytes from heifers superovulated with a controlled preovulatory LH surge. **Theriogenology**, v.52, p.335-349, 1999.

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.

VEDELER, A.; PRYME, L. F.; HESKETH, J. E. Insulin induces changes in the sub cellular distribution of actin and S-nucleotidase. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.108, p.67-74, 1991.

WANG, S.; LIU, Y.; HOLYOAK, G. R. The effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on the development of pre-and postcleavage-stage bovine embryos cultured in modified CR2 and M199 media. **Animal Reproduction Science**, v.48, p.37-45, 1997.

ZHANG, J.; ROBINSON, D.; SALMON, P. A novel function for selenium in biological system: selenite as a highly effective iron carrier for Chinese hamster ovary cell growth and monoclonal antibody production. **Biotechnology and Bioengineering**, v.95, p. 1188-1197, 2006.

