



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Thaís Thatiane dos Santos Souza

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES OVINOS NA  
PRESENÇA DE CAFEÍNA E VITAMINA E**

Petrolina – PE

2015

Thaís Thatiane dos Santos Souza

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES OVINOS NA  
PRESENÇA DE CAFEÍNA E VITAMINA E**

Trabalho apresentado à Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus de Ciências Agrárias, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Edilson Soares Lopes Júnior

Co-Orientadora: Profa. Dra. Mabel Freitas Cordeiro

Petrolina – PE

2015

Souza, Thaís Thatiane dos Santos

N972p Produção *in vitro* de embriões ovinos na presença de cafeína e vitamina E/ Thaís Thatiane dos Santos Souza. -- Petrolina, PE, 2015.

71 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus de Ciências Agrárias, Petrolina, 2015.

Orientador: Dr. Edilson Soares Lopes Júnior.

1. Ovinos. 2. Vitamina E. 3. Produção *in vitro*. 4. Cafeína. Íl.

Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD: 070.041

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Biblioteca

SIBI/UNIVASF

Bibliotecário:

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Thaís Thatiane dos Santos Souza

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM OVINOS NA PRESENÇA DE CAFEÍNA  
E VITAMINA E

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do título de Mestre em Ciência  
Animal, pela Universidade Federal do Vale do  
São Francisco.

Aprovada em: \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

**Banca Examinadora**

---

Edilson Soares Lopes Júnior, Doutor, UNIVASF

---

Mabel Freitas Cordeiro, Doutora, UNIVASF

---

Maria Helena Tavares de Matos, Doutora, UNIVASF

## DEDICATÓRIA

A minha avó Edite dos Santos (*in*  
*Memorian*)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por ter iluminado meu caminho, ter me dado força e o aprendizado ao longo do caminho para chegar até aqui.

Aos meus pais por me ensinar e me conscientizar de todos os valores sociais e morais, demonstrando que a família é a base de tudo.

Aos meus irmãos (Jacqueline, Thiago Patchanka e Fredson) por serem meus combustíveis nas horas difíceis, pelos ensinamentos, diversão e pela companhia.

Aos meus pequeninos sobrinhos (Felippy e Júlia) por me permitirem conviver com a essência pura de criança e poder participar ativamente do crescimento de vocês!!! A tia AMA!!!!

Ao meu orientador e amigo Edilson por sempre acreditar em mim, por me estimular nos momentos mais difíceis (e foram muitos...rsrsrs), por ensinar não apenas conteúdos de disciplinas, mas ensinar valores morais e ter esse dom de transformar o ambiente de trabalho na nossa segunda casa, por acrescentar nela o carinho, amor e amizade de cada um que compõe nosso grupo para que o convívio seja sempre confiável. A quem carinhosamente respeitamos como um pai, e não é de boca pra fora, é porque você tem o carinho, o respeito e a dedicação por cada um de nós. Agradeço hoje e sempre, e pode passar 50 anos e que terei o mesmo carinho, amizade e respeito por você. Tenho um enorme prazer e orgulho de ser parte dessa família LAFIBRA!

A minha co-orientadora e amiga Mabel pelos ensinamentos, paciência e dedicação! Por sempre estar disposta a ajudar e acrescentar não só na minha formação profissional!

Agradeço à Professora Alexandra Pereira que é mais que uma amiga, é um incentivo! Por sempre me ajudar nos momentos em que eu estava com tantas dificuldades científicas, pelos conselhos e ensinamentos de vida. Por ser um exemplo de profissional e de pessoa, além da sua alegria e humor contagiante!!!!

A nossa equipe do LAFIBRA que estiveram ao meu lado, dispostos a me ajudar não só no trabalho. Nos tornamos uma família! George e Helder, vocês se tornaram mais que meus “meninos do sêmen”, são meus amigos, que sei que posso contar a qualquer hora, pelos momentos estressantes serem quebrados por uma simples piada ou brincadeira. À Laísa pela sua espontaneidade, pelos conselhos, amizade e pelas nossas correntes de orações!!! Juliana (Jú), pela amizade, pela dedicação e por fazer parte da minha caminhada, pelos momentos de descontração e sei que sempre posso contar com você! As minhas filhotas Ana e Bruninha, por quem despertei um carinho imenso, por me ajudarem a desenvolver o dom da docência, pelo companheirismo, amizade em todas as horas (inclusive nas madrugadas), por tornarem nossas rotinas bem mais agradáveis. À Natalia (Nati), por ser estar sempre disposta a ajudar e colaborar, por esse exemplo de mulher e uma futura grande profissional. A minha None (Aionne) pela amizade e irmandade que somos!!!!

A minha eterna Mamis (Alane Pains), pelos ensinamentos e amizade. Com quem sei que sempre posso contar! Por ser um exemplo de profissional e pessoa.

Aos mestrandos Taís Jobard e Jonathan Maia pela amizade, pela paciência e pelos auxílios!

As minhas amigas Irmãs Lívia Magalhães (Sisss) e Mayara Miranda, que me ensinaram muitas lições de vida e me ajudaram nessa caminhada, pelos conselhos nos momentos de “aperto”, pelas comemorações nos momentos de alegria e pela força nos momentos difíceis... Agradeço sempre por Deus ter colocado vocês na minha vida! E, apesar da distância física, não nos desgradamos em nenhum momento!!!! AMO INCONDICIONALMENTE!!!!

As minhas companheiras de todos os dias e amigas, Marcela Formiga e Thiara, pela amizade, pelos conselhos, pela diversão a cada dia, pela ajuda de sempre, pela paciência. Amo vocês!

A minha ex filhotaaa (Ludmila) que, apesar dos ocorridos, sempre está presente. Obrigada pela amizade!

A minha amiga Carla Larissa pela amizade, conselhos, paciência e por me entender tão bem!!!

Ao professor Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas, por permitir meu estágio e treinamento no Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR), bem como a toda equipe do laboratório.

Aos professores Maria Helena, Elenice Moraes, João José, Rita de Cassia, por sanarem as minhas dúvidas, e não medirem esforços para isso, bem como a todos os professores que participaram da minha formação.

Ao Cema Fauna, pela concessão do microscópio invertido para o meu experimento, na pessoa da Professora Patrícia Nicola.

Ao BioFov como um todo, por sempre estarem de portas abertas para me ajudar e colaborar.

A Univasf e ao CPGCA pela minha formação.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Facepe) pela bolsa concedida.

Obrigada a todos que fizeram parte de mais etapa dessa caminhada!!!!

“Tu escolhes, recolhes, eleges, atraís, buscas, expulsas, modificas tudo aquilo que te rodeia a existência. Teus pensamentos e vontades são a chave de teus atos e atitudes... São as fontes de atração e repulsão na tua jornada vivência.”

*Chico Xavier*

## RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito do uso da vitamina E e da cafeína nas diferentes etapas da produção *in vitro* de embriões ovinos no Semiárido do Nordeste do Brasil. Foram utilizados ovários de ovelhas sem padrão racial definido, obtidos do abatedouro local do município de Petrolina-PE, que foram transportados em solução de NaCl 0,9% acrescida de antibiótico (penicilina), à de 33°C a 35°C até o Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal – LAFIBRA, UNIVASF. Os oócitos foram obtidos pela técnica de aspiração folicular com bomba de vácuo e rastreados e classificados sob estereomicroscópio. Os oócitos de melhor qualidade seguiram para a maturação *in vitro* (MIV), onde foram divididos, aleatoriamente, em 4 grupos: Grupos VE0, VE50, VE100 e VE200, que continham 0, 50, 100 ou 200 µM de vitamina E, respectivamente. O meio de base utilizado para a MIV foi o TCM-199, suplementado com 2,2 mg de bicarbonato de sódio, 5 mg de LH, 0,5 mg de FSH e 10% de soro fetal bovino. Os oócitos maduros seguiram para fecundação *in vitro* (FIV), onde foram divididos em 4 grupos: Grupo C0, C5, C10 e C20, que continham 0, 5, 10 ou 20 mM de cafeína, respectivamente. O meio FIV foi composto por SOF-FIV, contendo 40 µg de sulfato de gentamicina, 10% de soro de ovelha em estro (SOE) e 1 mg de heparina sendo a concentração de espermatozoides ajustada para  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Utilizou-se o tempo de co-cultivo de 22 horas, seguido por posterior avaliação dos presumíveis zigotos. Para comparação dos parâmetros, entre os grupos, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) *one-way*, seguida da realização do teste de Tukey. Os dados em porcentagem foram submetidos ao Teste de Fisher ou Qui-quadrado, por meio do software estatístico ASSISTAT (2011). As comparações foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . Não foi observada diferença estatística ( $P > 0,05$ ). Com relação à taxa de maturação oocitária não foi observada diferença estatística ( $P > 0,05$ ), entre grupos suplementados com diferentes concentrações de vitamina E. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para ambos os graus de picnose e retração. Não foi observada diferença significativa entre os grupos ( $P > 0,05$ ), porém, o grupo VE100 apresentou oócitos com coloração heterogênea. Através dessa avaliação, também foi observado que, dentro de cada tratamento, houve o predomínio significativo ( $P < 0,05$ ) de complexos cumulus oócitos homogêneos quando comparados às demais categorias (levemente heterogêneos e heterogêneos). O uso de 5 mM (C5) de cafeína como promotor de capacitação espermática de sêmen ovino para a FIV reduziu ( $P < 0,05$ ) a taxa de fecundação oocitária quando comparada ao grupo controle (C0). Conclui-se que a vitamina E não é capaz de promover aumento nas taxas de maturação oocitária de ovinos, mas não causa nenhum dano à célula em altas concentrações. A cafeína, quando utilizada na concentração de 5 mM reduz as taxas de fecundação *in vitro* de oócitos ovinos.

**Palavras-chave:** antioxidante, capacitação, MIV, FIV, ovelha.

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of the use of vitamin E and caffeine at different stages of in vitro production of sheep embryos in the semiarid Northeast of Brazil. Were used sheep ovaries without defined breed, obtained from a local slaughterhouse in the city of Petrolina-PE, which were transported in 0.9% NaCl solution plus antibiotics (penicillin) at 33 ° C to 35 ° C until the Laboratory of Physiology and Biotechnology of Animal Reproduction - LAFIBRA, UNIVASF. The oocytes were obtained by follicular aspiration technique vacuum pump and screened and classified under a stereomicroscope. The best quality oocytes followed for the in vitro maturation (IVM), which were randomly divided into 4 groups: Groups VE0, VE50, VE100 and VE200, containing 0, 50, 100 or 200 µM of vitamin E, respectively. The basic medium used for IVM was TCM-199 supplemented with 2,2 mg sodium bicarbonate, 5 mg of LH, FSH and 0.5 mg of 10% fetal bovine serum. The mature oocytes followed for in vitro fertilization (IVF), which were divided into 4 groups: Group C0, C5, C10 and C20, containing 0, 5, 10 or 20 mM caffeine, respectively. The medium consisted of IVF-IVF SOF containing 40 µg gentamicin sulfate, 10% sheep serum in estrus (NOS) and 1 mg of heparin concentration was adjusted to 1x10<sup>6</sup> sperm sperm / ml. The time used for co-cultivation of 22 hours, followed by further evaluating the presumptive zygotes. To compare the parameters between groups, analysis of variance (ANOVA) one way, then the completion of the Tukey test was used. The data in percent were submitted to Fisher's test or chi-square, using the statistical software ASSISTAT (2011). Comparisons were considered significant when  $P < 0.05$ . There was no statistical difference ( $P > 0.05$ ). Regarding the oocyte maturation rate was no statistical difference ( $P > 0.05$ ) between groups supplemented with different concentrations of vitamin E. There was no significant difference between treatments for both degrees of pyknosis and retraction. There was no significant difference between groups ( $P > 0.05$ ), however, the VE100 group had oocytes with heterogeneous staining. Through this evaluation, it was also observed that, within each treatment, there was a significant prevalence ( $P < 0.05$ ) of complex homogeneous cumulus oocytes when compared to the other categories (slightly heterogeneous and heterogeneous). The use of 5 mM (C5) of caffeine as sperm capacitation promoter ram semen for IVF reduced ( $P < 0.05$ ) oocyte fertilization rate when compared to the control group (C0). We conclude that vitamin E can not promote increase in oocyte maturation of sheep rates, but causes no damage to the cell in high concentrations. Caffeine, when used at a concentration of 5 mM reduce fertilization rates in vitro in ovine oocytes.

**Keywords:** antioxidant, capacitation, IVF, IVM, sheep.

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Punção folicular guiada por ultrassonografia em cabras (Fonte: Adaptado de Graff et al., 1999).....	25
Figura 2 – Oócitos de graus I (A), II (B), III (C) e IV (D) (Fonte: Adaptado de Leibfried e First, 1979).....	29
Figura 3 – Distribuição das organelas durante a maturação, fecundação oocitária, bem como a formação do zigoto. A) progressão da maturação nuclear e movimento das organelas do estágio de vesícula germinativa (VG) até MII e formação do zigoto. B) Distribuição de organelas e mecanismo de liberação dos grânulos corticais ( $Ca^{2+}$ ) após a entrada do espermatozoide no oócito durante a fecundação (Fonte: Adaptado de Ferreira et al., 2009).....	30
Figura 4 - Ovários em banho Maria à 34°C.....	45
Figura 5 – Punção dos ovários com bomba a vácuo.....	45
Figura 6 - Oócitos maturados em meio MIV com presença de vitamina E.....	46
Figura 7 – Embriões em estágios de clivagem.....	48
Figura 8 – Percentual de homogeneidade da coloração do ooplasma (homogêneo, levemente heterogêneo e heterogêneo) de complexos cumulus oócitos (CCOs) ovinos, maturados in vitro sob diferentes concentrações de Vitamina E (VE0 = 0 $\mu$ M; VE50 = 50 $\mu$ M; VE100 = 100 $\mu$ M; VE200 = 200 $\mu$ M). (P>0,05).....	50

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Efeito de técnicas de colheita sobre a quantidade e qualidade dos oócitos recuperados por ovário em caprinos Boer (Fonte: Wang et al., 2007).....	26
Tabela 2 – Efeito de duas diferentes técnicas de colheita na recuperação de oócitos em cabras iraquianas pretas (Fonte: Majeed et al., 2012).....	27
Tabela 3 – Classificação oocitária de acordo com a quantidade de células do <i>cumulus oophorus</i> e aspecto do citoplasma (Fonte: Adaptado de Gonçalves et al., 2008).....	28
Tabela 4 – O efeito da suplementação do meio MIV (TCM-199 + 10% FCS) com diferentes tipos de soro e fluido folicular sobre a MIV e FIV de oócitos ovinos (Fonte: Adaptado de Karami Shabankareh et al., 2011).....	33
Tabela 5 – Taxa de maturação oocitária (%) e percentual (média $\pm$ EPM) de oócitos com retração e picnose após maturação <i>in vitro</i> sob diferentes concentrações de Vitamina E (VE0 = 0 $\mu$ M; VE50 = 50 $\mu$ M; VE100 = 100 $\mu$ M; VE200 = 200 $\mu$ M).....	48
Tabela 6 – Taxa de fecundação oocitária (% médio) de complexos cumulus oócitos (CCOs), fecundados por espermatozoides ovinos capacitados <i>in vitro</i> sob diferentes concentrações de Cafeína (C0 = 0 mM; C5 = 5 mM; C10 = 10 mM; C20 = 20 mM).....	49

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

Be	Blastocisto Eclodido
BFF	Bovine Follicular Fluid (Fluido Folicular Bovino)
Bi	Blastocisto Inicial
Bl	Blastocisto
Bn	Blastocisto em Eclosão
BSA	Bovine Serum Albumin (Albumina Sérica Bovina)
Bx	Blastocisto Expandido
Ca <sup>2+</sup>	Íon Cálcio
CCO	Complexos Cumulus-Oócito
CIV	Cultivo <i>In Vitro</i> de Embriões
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CP	Corpúsculo Polar
DM-Hepes	Defined Medium-Hepes (Meio Definido - Hepes)
eCG	Equine Chorionic Gonadotrophin (Gonadotrofina Coriônica Equina)
EGF	Epidermal Growth Factor (Fator de Crescimento Epidermal)
EGS	Estrus Goat Serum (Soro de Cabra em Estro)
EPV	Espaço Perivitelínico
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
ESS	Estrus Sheep Serum (Soro de ovelha em estro)
FCS	Fetal Calf Serum (Soro Fetal Bovino)

Fert-TALP	Meio de Fecundação – Tyrodes-Albumina-Lactato- Piruvato
FIV	Fecundação <i>In Vitro</i>
FSH	Follicle Stimulating Hormone (Hormônio Folículo Estimulante)
GSH	Glutathiona
GVBD	Germinal vesicle breakdown (Quebra da vesícula germinativa)
hCG	Human Chorionic Gonadotropin (Gonadotrofina Coriônica Humana)
HMS	Human Menopausal Serum (Soro Humano em Menopausa)
IETS	International Embryo Transfer Society (Sociedade Internacional de Transferência de Embriões)
IGF	Insulin Growth Factor (Fator de Crescimento Insulínico)
LH	Luteinizing Hormone (Hormônio Luteinizante)
LIF	Leukemia Inhibitory Factor (Fator Inibidor de Leucemia)
LOPU	Laparoscopic Ovum Pick-Up (Colheita Oocitária Guiada por Laparoscopia)
Mc	Mórula Compacta
MEM	Meio Essencial Mínimo
Mi	Mórula Inicial
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
MIV	Maturação <i>In Vitro</i>
mL	Mililitro(s)
N <sub>2</sub>	Gás Nitrogênio

O <sub>2</sub>	Gás Oxigênio
OFF	Ovine Follicular fluid (Fluido Folicular Ovino)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PHE	Penicilamina-Hipotaurina-Epinefrina
PIV	Produção <i>In Vitro</i> de Embriões
RNA	Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucléico)
SFB	Soro Fetal Bovino
SOF	Synthetic Oviduct Fluid (Fluido Sintético de Oviduto)
TALP	Meio Tyrode-Albumina-Lactato-Piruvato
TCM-199	Tissue Culture Medium 199 (Meio de Cultivo Tecidual 199)
TUGA	Transvaginal Ultrasound Guided Aspiration (Aspiração Oocitária Guiada por Ultrassonografia Transvaginal)
VE	Vitamina E
VG	Vesícula Germinativa
μL	Microlitro(s)

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1. Produção <i>in vitro</i> de Embriões.....	22
2.2. Colheita de complexos cumulus-oócitos (CCOs).....	22
2.2.1. Colheita de CCOs a partir de animais vivos.....	23
2.2.2 Colheita de CCOs a partir de ovários de abatedouro.....	25
2.2. Seleção dos oócitos.....	27
2.3. Maturação <i>in vitro</i> de CCOs (MIV).....	29
2.3.1. Substâncias antioxidantes utilizadas nos meios MIV.....	33
2.4. Seleção e capacitação espermática.....	35
2.4.1. Meios capacitantes.....	37
2.5. Fecundação <i>in vitro</i> (FIV).....	39
2.6. Fatores que influenciam a PIV.....	40
3. JUSTIFICATIVA.....	42
4. OBJETIVOS.....	43
4.1. Objetivo geral.....	43
4.2. Objetivos específicos.....	43
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
5.1. Aspectos éticos.....	44
5.2. Local de execução.....	44
5.3. Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIV).....	44
5.3.1. Colheita e seleção de CCOs.....	44
5.3.2. Maturação <i>in vitro</i> de CCOs (MIV).....	46
5.3.3. Fecundação <i>in vitro</i> de CCOs (FIV).....	47
5.3.4. Avaliação dos presumíveis zigotos.....	47
5.4. Parâmetros avaliados.....	48
5.5. Análise estatística.....	48
6. RESULTADOS.....	49
7. DISCUSSÃO.....	51
8. CONCLUSÕES.....	56
9. REFERÊNCIAS.....	57



## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de tecnologias de reprodução assistida possibilita a maximização do desempenho do melhoramento genético. Na tentativa de acelerar o ganho genético e aumentar o potencial reprodutivo dos pequenos ruminantes, as biotecnologias da reprodução animal, como Inseminação Artificial (IA) e a Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões (MOTE) podem ser utilizadas, porém ainda existem muitas variações nos resultados obtidos. Recentemente, despertou-se o interesse pela técnica de Produção *In Vitro* de embriões (PIV). Além disso, a PIV é um instrumento de suporte para outras biotécnicas, tais como a Clonagem e Transgênese. Sua aplicação em escala comercial se tornou viável após o advento da aspiração folicular *in vivo* e pelo aperfeiçoamento das condições de Cultivo *In Vitro* (CIV).

Dessa forma, a PIV acelera a produção de animais geneticamente superiores e impede, através da punção e aspiração folicular *in vivo*, o descarte precoce de fêmeas geneticamente privilegiadas, mas que não conseguem se reproduzir de maneira natural. As principais etapas envolvidas na PIV vão desde a colheita, Maturação *In Vitro* (MIV) e Fecundação *In Vitro* (FIV) dos oócitos, bem como, o Cultivo *In Vitro* (CIV) de embriões (GONÇALVES et al., 2008).

Apesar de inúmeras melhorias nas técnicas que têm sido empregadas para auxiliar a PIV, muitos aspectos ainda precisam ser melhorados, incluindo os protocolos hormonais para aspiração folicular, técnicas de colheita de oócitos e em procedimentos de MIV, FIV e CIV, até o momento da transferência de embriões. Problemas comuns são, muitas vezes, as grandes distâncias entre os laboratórios de FIV e as propriedades onde os animais estão alojados (MAX et al., 2012).

Segundo Varago; Mendonça; Lagares, (2008), é importante uma compreensão das exigências metabólicas e fisiológicas dos oócitos e dos espermatozoides para a obtenção de boas taxas de MIV e FIV, sendo necessária a realização de novas pesquisas para que se consiga uma condição ideal para MIV de oócitos e para que estes possam ser fecundados. Nesse contexto, as vitaminas antioxidantes têm sido consideradas importantes para complementar os meios *in vitro*, especialmente, o alfa tocoferol (vitamina E), estando seus resultados positivos condicionados às concentrações utilizadas. Visando, ainda, reduzir a polispermia, melhorando as taxas de fecundação *in vitro* e as taxas de desenvolvimento embrionário, relatos têm

apontado, em diversas espécies, a cafeína como promotor de capacitação espermática, quando utilizada no meio de FIV (CAMPBELL;Maalouf; Lee, 2009). Contudo, é conhecida a carência de informações relacionadas à utilização da vitamina E e da cafeína nas diferentes etapas da PIV de embriões ovinos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Produção *in vitro* de embriões (PIV)

A PIV desponta como uma ferramenta promissora, uma vez que possibilita a utilização otimizada de fêmeas doadoras de oócitos, assim como o aumento da quantidade de embriões produzidos (SIMPLÍCIO; FREITAS; FONSECA, 2007). Essa biotécnica abrange desde a colheita dos complexos *cumulus*-oócitos (CCOs), acompanhada pela maturação e posterior fecundação dos oócitos *in vitro* até o cultivo embrionário (BALDASSARRE, 2008). A eficiência dessa biotecnologia está associada, especialmente, à qualidade do oócito, uma vez que ela é diretamente proporcional à presença das células do *cumulus*, assim como, as particularidades dos procedimentos de recuperação dos CCOs (RODRIGUEZ et al., 2006).

### 2.2. Colheita de complexos *cumulus*-oócitos (CCOs)

Os oócitos utilizados para PIV podem ser obtidos de fêmeas adultas ou pré-púberes submetidas ou não a protocolos de estimulação hormonal. Esses protocolos são indicados, principalmente, para fêmeas pré-púberes, em anestro estacional ou em fêmeas geneticamente superiores. Nesse contexto, o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) ou o Hormônio Luteinizante (LH) são utilizados em doses únicas e/ou fracionadas, associado ou não ao uso da Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG), 24 ou 48 horas antes da aspiração (BALDASSARRE et al., 1996; ANEL et al., 1997; PTAK et al., 1999).

Os complexos *cumulus* oócitos (CCOs) podem ser recuperados, utilizando bomba a vácuo, tanto por técnicas *in vivo* quanto *in vitro*. As técnicas *in vivo* são as aspirações foliculares guiadas por laparotomia, por laparoscopia (LOPU – Laparoscopic ovum pick-up) e por ultrassonografia transvaginal (TUGA – Transvaginal ultrasound guided aspiration); e as *in vitro*, a partir de ovários de abatedouro constituem-se numa fonte abundante e de baixo custo para a pesquisa (GIBBONS et al., 2008), sendo elas a *slicing* e a aspiração folicular com agulha acoplada à seringa ou bomba a vácuo.

### **2.2.1. Colheita de CCOs a partir de animais vivos**

#### *Aspiração folicular por Laparotomia*

A Laparotomia é uma técnica cirúrgica eficaz, por permitir a recuperação de uma grande quantidade de oócitos para aspiração folicular (KÜHHOLZER et al., 1997), porém apresenta alguns entraves para o seu sucesso prolongado. Um deles é a impossibilidade do seu uso sucessivo, que leva ao desenvolvimento de aderências de ovários e órgãos adjacentes ao sistema genital (VALLET et al., 1987; ANDRIOLI-PINHEIRO, 1993). Além disso, provoca estresse animal devido à anestesia e à cirurgia, é um método de custo elevado e limita o uso da doadora (PAULA et al., 2008). Utilizando esta técnica, Max et al. (2012) obtiveram uma média de  $9,8 \pm 5,7$  oócitos coletados de ovelhas.

#### *Laparoscopic ovum pick-up (LOPU) - Aspiração folicular por Laparoscopia*

A LOPU, por ser um procedimento menos invasivo que a laparotomia, pode ser repetida diversas vezes na mesma fêmea, reduzindo o estresse sofrido pelo animal, em virtude do reduzido tempo de execução (KÜHHOLZER et al., 1997; TEIXEIRA, 2010). Além disso, permite a obtenção de CCOs e, posteriormente, crias em situação em que MOTE não pode ser aplicada tais como em animais pré-púberes, gestantes, púberes e com idade avançada (BALDASSARRE et al., 2002). O procedimento dura, geralmente, de 15 a 20 minutos por doadora de oócito. E a taxa de colheita é semelhante àquela observada por uso de laparotomia (COGNIÉ et al., 2004). O sucesso desta técnica para obtenção de um número maior de oócitos de qualidade está relacionado ao tipo de agulha, bem como, à pressão de vácuo utilizada (CORDEIRO, 2006).

Com o objetivo de preservar a adesão das células do *cumulus* ao oócito de cabras e ovelhas Cognié et al. (2004) utilizaram agulhas 18 G adaptadas a tubos de silicone e realizaram aspiração folicular sob pressão de vácuo de 25 mmHg, resultando em uma taxa de recuperação oocitária de 50 a 60%.

Avelar (2009) obteve uma taxa de recuperação de oócitos de 74,5% após laparoscopia em cabras Canindé. Já Gibbons et al. (2007) e Abdullah et al. (2008),

conseguiram taxas de 25 a 70%, enquanto Baldassarre et al. (2003) taxas de 80% de recuperação oocitária.

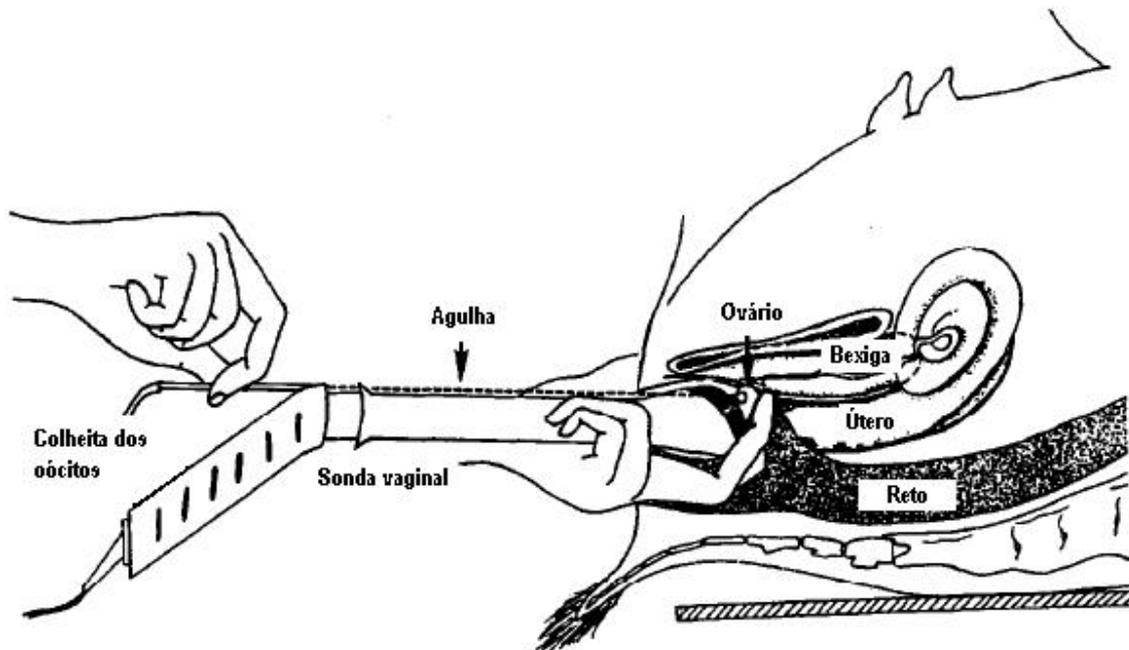
### *Aspiração folicular guiada por ultrassonografia transvaginal (TUGA)*

A TUGA é uma técnica que foi desenvolvida na década de 80, com o intuito de atender à demanda por um procedimento para colheita de CCOs que fosse menos traumática que as abordagens cirúrgicas utilizadas. A TUGA foi, rapidamente, reconhecida como a técnica de eleição para a recuperação de CCOs em bovinos (GALLI et al., 2001), sendo desenvolvida, para caprinos, por Graaf et al. (1995). Esta apresenta, como vantagens, o fato de ser pouco invasiva, não depender de pré-estimulação hormonal, poder ser utilizada em qualquer fase do ciclo estral, em animais pré-púberes ou em gestação inicial, chegando a ser considerada a melhor alternativa aos programas clássicos de produção de embriões por superovulação (BOUSQUET et al., 1999). Além disso, a TUGA permite maximizar o aproveitamento de oócitos, levando-os a um sistema de PIV (PIETERSE; KAPPEN, 1992; SENEDA et al., 2005).

Graff et al. (1999) obtiveram entre 60 e 78% de taxa de colheita oocitária após realização da TUGA. No entanto, esse método ainda é pouco utilizado em caprinos e vem sendo alvo de estudos para seu aprimoramento e futura utilização em larga escala (PAULA et al., 2008).

Apesar da TUGA ser um método de coleta de CCO amplamente utilizada em várias espécies, o seu uso em pequenos ruminantes ainda é muito limitado (Figura 1) devido às restrições anatômicas representarem um refreamento importante, principalmente em fêmeas de menor porte, tornando-se de difícil execução até para operadores com habilidade, em virtude da dificuldade de realizar a manipulação de ovário através da vagina (BALDASSARRE et al., 1994; 1996; GRAFF et al., 1999).

Figura 1 – Punção folicular guiada por ultrassonografia em cabras (Fonte: Adaptado de Graff et al., 1999).



### **2.2.2. Colheita de CCOs a partir de ovários de abatedouro**

#### Técnica de fatiamento do ovário (Slicing)

Essa técnica possibilita a obtenção de oócitos por meio da dissecação de folículos com 2 a 6 mm de diâmetro, utilizando uma lâmina de navalha, permitindo, assim, o acesso a folículos localizados profundamente dentro do córtex do ovário e resultando na recuperação de maior quantidade de CCOs do que o método da aspiração folicular com agulha acoplada à seringa (COGNIÉ, 1999; WANI et al., 2000). Trabalhos mostram que a técnica de *Slicing* é eficiente na colheita de CCOs, além de obter oócitos de boa qualidade (Tabela 1; WANG et al., 2007) (Wani et al. (1999); Shirazi et al., 2005).

Tabela 1 – Efeito de técnicas de colheita sobre a quantidade e qualidade dos oócitos recuperados por ovário em caprinos Boer (Fonte: Adaptado de Wang et al., 2007).

Métodos de colheita	Número de ovários	Número de oócitos por ovário			
		Bom (%)	Regular (%)	Ruim (%)	Total
Slicing	31	3,9 <sup>a</sup> (61,9)	1,3 <sup>a</sup> (20,6)	1,1 <sup>a</sup> (17,5)	6,3 <sup>a</sup>
AFS*	29	1,4 <sup>b</sup> (48,3)	0,5 <sup>a</sup> (17,2)	1,0 <sup>a</sup> (34,5)	2,9 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Valores com letras sobrescritas diferentes na mesma coluna, diferem significativamente (P<0,05). \*AFS: aspiração folicular com seringa.

Porém, essa técnica apresenta algumas desvantagens. Por ser uma técnica demorada e gerar muitos debris celulares, dificulta a posterior procura e avaliação dos oócitos na placa, o que implica na necessidade de maior treinamento do indivíduo que atua nesse segmento (WANI, 2002). Além disso, os oócitos oriundos de pequenos folículos são menos aptos a se desenvolver após a FIV (COGNIÉ; BARIL, 2002).

### Aspiração folicular

A técnica de aspiração folicular com agulha acoplada à seringa ou à bomba a vácuo é o método de eleição para colheita de oócitos de ovários provenientes de abatedouro (BERNARDI, 2005). De acordo com Wani et al. (2000), esse é o método mais simples e rápido, permitindo a obtenção de CCOs de melhor qualidade, caracterizados pela presença das células do cumulus. A quantidade e a qualidade dos CCOs obtidos estão relacionadas aos aspectos físicos envolvidos em tal técnica, podendo haver discrepância entre autores com relação aos resultados obtidos.

Dentre os aspectos físicos, estão o fluxo e a pressão de aspiração, mensurados por mL/minuto ou em mmHg, respectivamente, que estão diretamente relacionados à eficiência da recuperação de CCOs. As pressões de aspiração com bomba a vácuo, consideradas ótimas por Baldassarre et al. (2003) e Koeman et al. (2003), em ovinos e caprinos é de 25 mmHg. Pressões mais elevadas, na ordem de 100 mmHg, resultam em uma menor quantidade de CCOs de qualidade (MORTON et al., 2008).

De acordo com Rodríguez et al. (2006), quando se compara o efeito da pressão e do fluxo de aspiração sobre a taxa de desenvolvimento embrionário, outros aspectos devem ser considerados, tais como o comprimento e diâmetro da cânula de aspiração, bem como o comprimento e calibre da agulha. Estes mesmos autores relatam, ainda, que, enquanto o calibre (18 ou 20) não afeta a eficiência da aspiração folicular, melhores resultados são obtidos quando se utiliza agulhas curtas (1 ou 2 mm). Isto porque, quanto menor o trajeto percorrido pelos CCOs, menores são os danos sofridos.

Segundo Majeed et al. (2012), a taxa de recuperação é maior e os oócitos de melhor qualidade quando se utiliza a técnica de aspiração em comparação com o método de *slicing* (Tabela 2; MAJEED et al., 2012), sendo os resultados obtidos em caprinos (RAHMAN et al., 2009) semelhantes àqueles em ovinos (WANI et al., 2000). Já Morton et al. (2007), utilizando o método de colheita por bomba de vácuo, mostraram taxas de recuperação 73,1%.

Tabela 2 – Efeito de duas diferentes técnicas de colheita de recuperação de oócitos cabras iraquianas pretas (Fonte: Adaptado de Majeed et al., 2012).

Método de colheita	Nº total de ovários	Nº de folículos	Nº de oócitos	Nº de oócitos/ovário	Graus		
					Bom	Regular	Ruim
AFBV*	614	1821	1401	2,28 ± 0,23 <sup>a</sup>	30,0%	62,5%	7,4%
Slicing	584	1264	884	1,51 ± 0,28 <sup>b</sup>	33,7%	38,9%	27,4%
Total	1198	3085	2285	1,90 ± 0,25 <sup>b</sup>	-	-	-

<sup>a,b</sup> Valores com letras sobrescritas diferentes na mesma coluna, diferem significativamente (P<0,05). \*AFBV: aspiração folicular com bomba a vácuo.

### **2.3. Seleção dos oócitos**

Após a colheita *in vivo* dos oócitos, estes são transportados em meio de maturação, que, normalmente, é composto por meio TCM 199 (*Tissue Culture Medium 199*), suplementado com bicarbonato, Soro Fetal Bovino (SFB), Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG), FSH, estradiol, piruvato e amicacina, a

temperatura de 36°C. O ideal é que o tempo de transporte não ultrapasse as 8 horas do início da colheita (RENESTO; COELHO, 2004).

Os oócitos são classificados de acordo com sua morfologia para permitir estimar seu potencial de maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário. De acordo com Seneda et al. (2001) e Gonçalves et al. (2008), os oócitos são classificados numa escala de 1 a 4, na qual são consideradas características das células do *cumulus*, as quais devem, na forma de várias camadas compactas, envolver o oócito, bem como de aspectos relacionados ao ooplasma, que deve estar homogêneo, com granulações finas e coloração marrom (Tabela 3; Figuras 2).

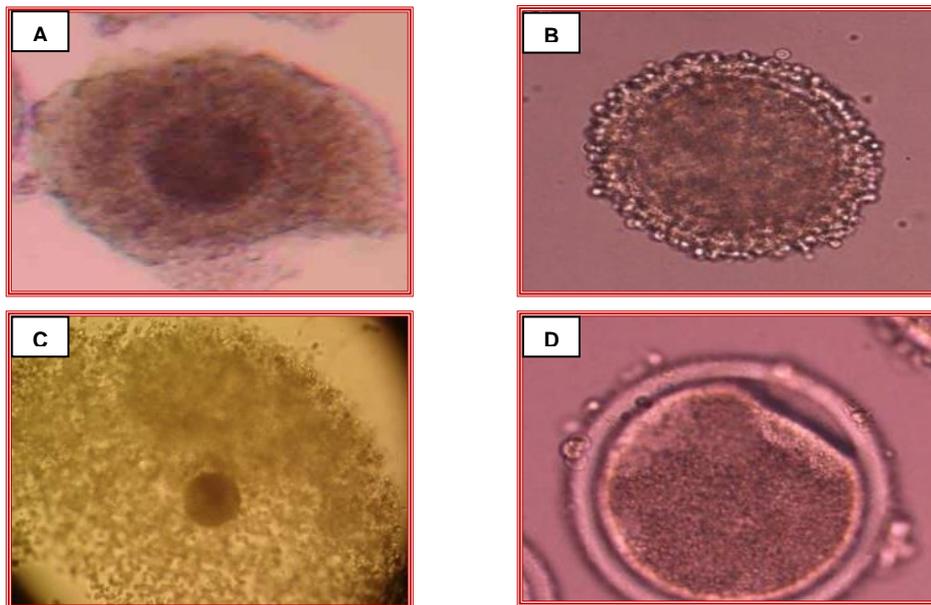
Tabela 3 – Classificação oocitária de acordo com a quantidade de células do *cumulus oophorus* e aspecto do citoplasma (Fonte: Adaptado de Gonçalves et al., 2008).

Graus	Características
I	Apresenta-se com células do <i>cumulus</i> envoltas em mais de três camadas, com citoplasma homogêneo, com granulações finas, preenchendo completamente o interior da zona pelúcida e de coloração marrom.
II	As células do <i>cumulus</i> encontram-se parcialmente compactadas, em menos de três camadas celulares. O citoplasma possui granulações distribuídas de maneira heterogênea, podendo estar mais concentradas em determinados locais, também preenche completamente a zona pelúcida.
III	As células do <i>cumulus</i> demonstram-se presentes, porém expandidas. O ooplasma fica contraído, degenerado, vacuolizado ou fragmentado, preenchendo irregularmente a zona pelúcida.
IV	Ausência de células do <i>cumulus</i> , apresentando-se desnudo.

Sabe-se que a retirada das células do *cumulus* durante a obtenção dos oócitos os torna menos competentes à maturação, já que, *in vivo*, estas células são importantes para o ambiente intra-folicular de desenvolvimento do oócito (COGNIÉ et al., 2004).

Para a MIV, os oócitos com citoplasma irregular, desnudos ou semi desnudos são eliminados e os oócitos com citoplasma levemente granuloso, com múltiplas camadas de *cumulus* (CCO Grau I) ou com, no mínimo, uma a três camadas uniformes de células do *cumulus* (Grau II), são selecionados para maturação (BALDASSARRE et al., 2003; COGNIÉ et al., 2004).

Figura 2 – Oócitos caprinos de graus I (A), II (B), III (C) e IV (D) (Fonte: Arquivo Pessoal).



#### **2.4. Maturação *In Vitro* de CCOs (MIV)**

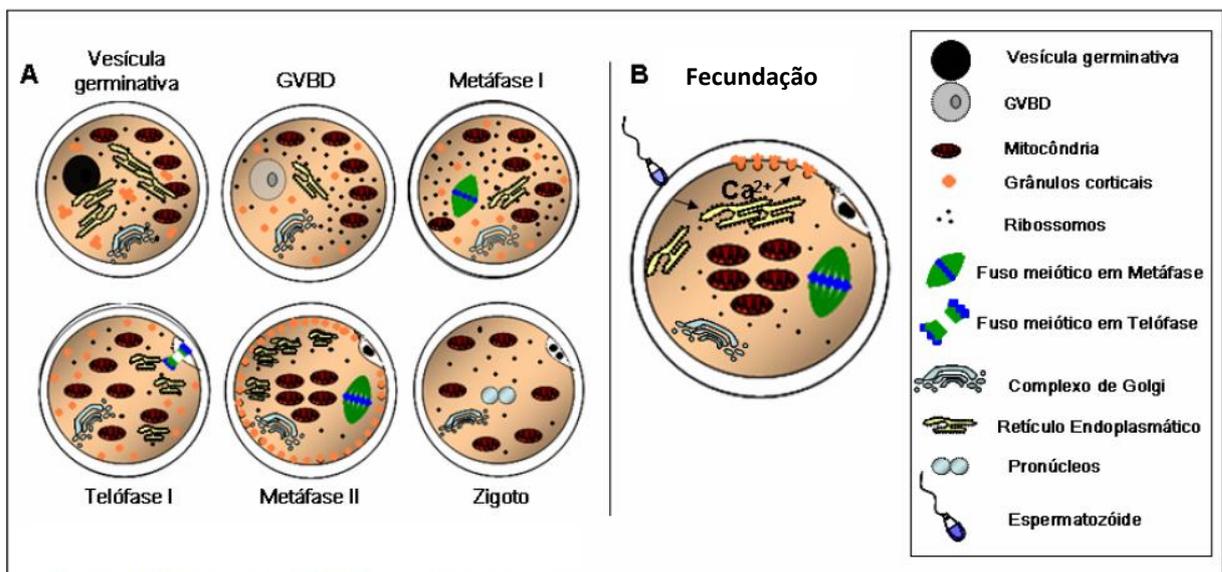
De acordo com Gonçalves et al. (2008), a maturação do oócito envolve uma série de transformações, tais como modificações nucleares, citoplasmáticas e moleculares, estando estas ligadas a uma série de mudanças estruturais e bioquímicas que tornam o gameta feminino apto para ser fecundado e, posteriormente, se desenvolver (Figura 3).

Em condições *in vivo*, a maturação tem início logo após o pico pré-ovulatório de LH, enquanto que, em meio *in vitro*, este processo se inicia com a remoção do oócito do interior do folículo ovariano (HOSHI, 2003).

O processo de maturação envolve duas etapas principais. A primeira, a maturação nuclear, compreende a condensação do material nuclear para formar a placa metafásica, seguida por dois ciclos meióticos. Já a segunda etapa é a

maturação citoplasmática, que infere na redistribuição de organelas (SZOLLOSI, 1993).

Figura 3 – Distribuição das organelas durante a maturação, fecundação oocitária, bem como a formação do zigoto. A) Progressão da maturação nuclear e movimento das organelas do estágio de vesícula germinativa (VG) até MII e formação do zigoto. B) Distribuição de organelas e mecanismo de liberação dos grânulos corticais ( $\text{Ca}^{2+}$ ) após a entrada do espermatozoide no oócito durante a fecundação (Fonte: Adaptado de Ferreira et al., 2009).



Na maturação nuclear *in vivo*, a competência meiótica inicia-se durante a formação do antro, onde o oócito permanece em prófase I até que ocorra o pico de LH. Os oócitos permanecem bloqueados no estágio de dictióteno, da prófase I, conhecido como vesícula germinativa (VG) até completarem seu desenvolvimento (MEHLMANN, 2005). Após o pico de LH, ocorre a retomada da meiose, caracterizada pela quebra da VG e posterior condensação de cromossomos e formação do fuso da metáfase I (MI). Essa primeira divisão da meiose completa-se com a segregação de cromossomos homólogos entre o oócito e o primeiro corpúsculo polar, levando o oócito à metáfase II (MII), em que permanecerá até que ocorra a fecundação (DEKEL, 2005). Essa maturação nuclear ocorre entre 16 e 24 h após o início da MIV (COGNIÉ et al., 2003).

A etapa de maturação citoplasmática pode ser considerada como o conjunto de processos pelo qual o oócito passa para tornar-se uma célula capaz de ser

fecundada e dar suporte ao desenvolvimento embrionário inicial. Estas mudanças incluem a redistribuição das organelas celulares, dentre elas os grânulos corticais, a estocagem de proteínas e RNA mensageiro, o desenvolvimento de mecanismos regulatórios do cálcio, entre outros (ANGUITA et al., 2007).

Quando oócitos imaturos são removidos dos folículos, estes se tornam capazes de sofrer maturação nuclear, sem nenhum estímulo hormonal. No entanto, não são capazes de atingir seu desenvolvimento completo até o estágio essencial para sua maturação. Com isso, faz-se necessária a adição de gonadotrofinas e esteroides, para que ocorra o desenvolvimento completo após a FIV (COELHO et al., 2002).

O alcance de resultados positivos, na tentativa de induzir a maturação nuclear e citoplasmática, dependem da adição de fatores como o FSH, LH, Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH), estradiol, cisteamina, glutamina, piruvato de sódio, soro de fêmea em estro, soro fetal ou fluido folicular de folículos não atrésicos ao meio de maturação, além de condições ambientais adequadas como a tensão de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, temperatura, umidade e tempo de maturação nuclear *in vitro* (BECKER et al., 2002; FREITAS et al., 2002; COGNIÉ et al., 2003; MARTINS Jr.; BRACKETT, 2003; COGNIÉ et al., 2004; LEONI et al., 2007; PEREIRA-BONNET et al., 2008) e, alternativamente, fatores de crescimento, como Fator de Crescimento semelhante à Insulina (IGF-1), Fator de Crescimento Epidermal (EGF), Fator Inibidor de Leucemia (LIF) e peptídeos intra ovarianos em meios semi definidos, com albumina sérica bovina (BSA) ou definidos, sem presença de BSA (WARD et al., 2002; COGNIÉ et al., 2004; PTAK et al., 2006). Wani et al. (2012) avaliaram o efeito da cisteamina e do EGF no meio de maturação de oócitos ovinos, obtendo as taxas de maturação de 84,9%, 69,9% e 67,2% para os meios suplementados com EGF, cisteamina e grupo controle, respectivamente. Segundo Baldassarre et al. (1996), os oócitos caprinos e ovinos são geralmente maturados em TCM-199 tamponado e suplementado com piruvato e hormônios (FSH, LH, estradiol).

A adição de aminoácidos ao meio de MIV aumenta o desenvolvimento embrionário, o número de células embrionárias e a probabilidade de implantação pós-transferência. Além disso, estas substâncias atuam em diversas funções celulares, fornecendo um “pool” de precursores de proteínas, que regulam o metabolismo do embrião, o pH intracelular e atuam como controladores da osmolaridade, promovendo, assim, o desenvolvimento e a diferenciação embrionária (LEE ; FUKUI, 1996; GARDNER; LANE, 1997).

Algumas pesquisas realizadas têm demonstrado que o uso de FSH é suficiente para promover o desenvolvimento de oócitos imaturos após MIV e FIV (EYESTONE; BOER, 1993). Outras demonstram o efeito benéfico somente do LH e/ou do estradiol (GULER et al., 2000). Outros pesquisadores ressaltam o efeito sinérgico das gonadotrofinas associadas (FSH e LH) ao estradiol (VAN DE LEEMPUT et al., 1999; HASLER, 2000).

Garcia et al. (1995) e Avery et al. (1995), utilizando eCG associado ao hCG para MIV dos oócitos, obtiveram resultados conflitantes e, provavelmente, decorrentes das concentrações e das diferentes fontes hormonais utilizadas.

A maioria dos laboratórios utiliza o TCM como meio base para a MIV. Existem poucos relatos sugerindo que outro meio possa ser mais apropriado (GORDON, 1994; GONÇALVES et al., 2008). O TCM-199 pode ser modificado de acordo com cada laboratório, sendo adicionado, frequentemente, de piruvato, lactato, bicarbonato de sódio, vitaminas, aminoácidos, entre outras substâncias acrescidas nas concentrações encontradas no soro sanguíneo. Já a suplementação dos meios de maturação com o FSH e o LH é importante, enquanto a com estrógeno é opcional (GORDON, 1994; MINGOTI, 2005; GONÇALVES et al., 2007).

Dentre os fatores que interferem na maturação oocitária, pode-se citar a idade da doadora de oócitos, a qualidade do oócito, diâmetro dos folículos e suplementos adicionados ao meio de maturação, como os substratos energéticos, aminoácidos e fatores de crescimento (WATSON et al., 2000).

Alguns trabalhos mostram a importância de suplementar o meio MIV com soro (DORLAND et al., 1994; KRISHER et al., 1999; RIZOS et al., 2003), levando a diferenciações fisiológicas e morfológicas, tais como melhoria no posterior desenvolvimento embrionário. O soro é uma combinação complexa de componentes, tais como proteínas, ácidos graxos, vitaminas, hormônios, entre outros (HARPER et al., 1993). Outros autores mostraram que a MIV é incompleta sem a suplementação com soro (SAKAGUCHI et al., 2000), pois este nutre as células que circundam o oócito e impede o enrijecimento da zona pelúcida no ambiente folicular (WANI et al., 2002).

Além disso, Karami Shabankareh et al. (2011), avaliando o efeito de diferentes meios de maturação em oócitos ovinos suplementado com soro de diferentes espécies (HMS – Soro de Humano em Menopausa, ESS – Soro de Ovelha em Estro, EGS – Soro de Cabra em Estro, OFF – Fluido Folicular Ovino e BFF – Fluido

Folicular Bovino), puderam observar que a adição de HMS e ESS aumenta significativamente as taxas de maturação, enquanto que os demais não apresentaram efeito (Tabela 4; KARAMI SHABANKAREH et al., 2011).

Tabela 4 – O efeito da suplementação do meio MIV (TCM-199 + 10% FCS) com diferentes tipos de soro e fluido folicular sobre a MIV e FIV de oócitos ovinos (Fonte: Adaptado de Karami Shabankareh et al., 2011).

Grupos Tratamento ***	Nº de estruturas na MIV (n)	Nº de oócitos maturados (%)	Nº de estruturas na FIV (n)	Nº de oócitos fertilizados (%)
T1 = Controle	237	178 (75,1) <sup>c</sup>	178	115 (64,6) <sup>c</sup>
T2 = 20% HMS	314	289 (92,0) <sup>a</sup>	289	260 (90,0) <sup>a</sup>
T3 = 20% ESS	292	261 (89,3) <sup>ab</sup>	261	231 (88,5) <sup>ab</sup>
T4 = 20% EGS	216	191 (88,4) <sup>b</sup>	191	164 (85,8) <sup>b</sup>
T5 = 20% OFF	254	175 (68,9) <sup>d</sup>	175	104 (59,4) <sup>cd</sup>
T6 = 20% BFF	218	146 (67,0) <sup>d</sup>	146	88 (60,3) <sup>d</sup>

a, b, c, d Valores com letras sobrescritas diferentes na mesma coluna, diferem significativamente (P<0,05).

Com o objetivo de avaliar o efeito da inclusão de vitaminas, em várias concentrações (0,0 M – Controle; 0,5 M; 1,0 M; 1,5 M) no meio MIV (MEM + SOF) sobre o subsequente desenvolvimento embrionário dos oócitos ovinos, Kafilzadeh et al. (2012) demonstraram taxas de desenvolvimento embrionário total de 19,50%, 21,62%, 22,33% e 15,59% para o grupo controle, 0,5 M, 1,0 M e 1,5 M, respectivamente, denotando que a segunda e terceira concentrações de vitaminas, aumentaram, significativamente, o desenvolvimento embrionário, indicando, ainda, a possibilidade de que a presença de algumas vitaminas no MEM, em concentrações elevadas, poderiam ter efeito negativo na MIV de oócitos ovinos.

#### **2.4.1. Substâncias antioxidantes utilizadas nos meios MIV**

Atualmente, também se utiliza no meio MIV antioxidante, que são substâncias que podem otimizar a maturação (BORMANN et al., 2003). Kim et al. (2011), testando suplementação vitamínica na maturação de oócitos suínos, constataram

um aumento do número de substâncias sendo transportadas ativa ou passivamente para dentro da célula, evitando, assim, a perda da viabilidade de oócitos em condições ótimas de cultivo e aumentando o efeito de hormônios do meio como hCG, EGF e PMSG. Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelo estresse oxidativo resultante de vários processos de metabolismo normal das células (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Sua ação protetora ocorre antes que espécies reativas de oxigênio (EROs) ataquem as células, destruam a membrana plasmática e resulte na formação de peróxido, o qual reage com oxigênio (SALES, 2005).

Devido ao metabolismo acentuado durante a MIV, o uso de antioxidantes parece ser um fator benéfico aos oócitos, pela produção de EROs que podem causar danos como a inativação enzimática e fragmentação de DNA (SAKAMOTO et al., 2008).

Os efeitos negativos das EROs são causados por uma superprodução endógena e exógena de fontes que conduzem a um desequilíbrio no metabolismo redox da célula, levando a um estresse oxidativo. A adição de substâncias antioxidantes, como o cobre, selênio, zinco, magnésio, ácido ascórbico (vitamina C) e  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) podem eliminar ou auxiliar na eliminação das EROs (SOCACIU, 2002; MICLEA et al., 2012).

Também podem ser adicionados aos meios da PIV, cisteína (CAAMAÑO et al., 1998; ALI et al., 2003), cisteamina (YAMAUCHI; NAGAI, 1999) e vitaminas (BORMANN et al., 2003). Nesse sentido, o uso de vitaminas pode ser uma alternativa para a melhoria da MIV de oócitos. A vitamina C mostrou que pode ser utilizada durante a MIV ou CIV para incrementar a produção embrionária além de melhorar a qualidade dos blastocistos eclodidos, independentemente da atmosfera gasosa de cultivo (POZZOBON, 2008). Já a vitamina A e seus derivados possuem efeitos benéficos na PIV de embriões, no desenvolvimento folicular, na fase de pré-implantação embrionária de bovinos (GOMEZ et al., 2006). Além disso, a vitamina A é importante no crescimento, morfogênese e diferenciação celular, sendo constatada em uma melhora na obtenção de blastocistos *in vitro* (HIDALGO et al., 2003), na maturação oocitária e ação antioxidante (LIVIGSTON et al., 2004).

Os mais importantes antioxidantes lipossolúveis das células são os tocoferóis, que protegem os ácidos graxos poli-insaturados das membranas contra as EROS e, por conseguinte, melhoram o desenvolvimento embrionário (ANDRADE et al., 2010).

A vitamina E ou  $\alpha$ -Tocoferol é considerada um antioxidante biológico, protegendo as células do estresse oxidativo. Ela é um potente limpador de radical peroxil e pode proteger ácidos graxos poli-insaturados dentro de fosfolipídios das membranas biológicas e nas lipoproteínas plasmáticas (TRABER et al., 1999), podendo, portanto, ser acrescida ao meio MIV, otimizando a maturação oocitária.

Porém, poucos estudos vêm sendo realizados no tocante ao real efeito das vitaminas no meio MIV (BORMANN et al., 2003), sendo a maior parte deles voltados para a utilização das vitaminas no meio de FIV quanto à produção de blastocisto (SHABANKAREH et al., 2011).

## **2.5. Seleção e capacitação espermática**

A FIV deve utilizar um meio capaz de promover a capacitação espermática. As técnicas comumente utilizadas para seleção de espermatozoides vivos, bem como para sua separação dos demais componentes do sêmen e dos crioprotetores, são o método de migração ascendente (*swim up*) e o gradiente de Percoll<sup>®</sup> (GONÇALVES et al., 2008).

No *swim up*, os espermatozoides vivos são separados dos mortos, do plasma seminal e dos componentes dos diluidores pela motilidade ascendente. Esse processo consiste em depositar 100  $\mu$ L de sêmen no fundo de tubos de centrifuga (15 mL), contendo 1 mL de meio TALP (Tyrode-Albumina-Lactato-Piruvato), de maneira que o sêmen permaneça no fundo do tubo coberto pelo meio TALP. Em seguida, esses tubos devem ser colocados em ambiente a 39°C (alguns laboratórios incubam o sêmen em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada), permitindo que os melhores espermatozoides migrem para a posição superior do meio e os demais constituintes do sêmen permaneçam no fundo do tubo. Em uma segunda etapa, o sobrenadante é aspirado de forma a não permitir que os componentes do sêmen no fundo do tubo entrem, novamente, em contato com os espermatozoides selecionados e, em seguida, essa amostra é transferida para outro tubo, a fim de ser centrifugada, em rotação de 700 a 900g, por 5 min. Posteriormente, colhe-se o pellet formado no fundo do tubo, adicionando-se o volume necessário para se obter a concentração final de 1 a 2 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL, valor essencial para a fecundação (GONÇALVES et al., 2008).

Diferentes gradientes de concentração podem ser utilizados para permitir a separação dos espermatozoides vivos e de melhor motilidade dos demais constituintes do sêmen, com base na diferença de densidade. O Percoll<sup>®</sup> é composto por partículas de sílica coloidal, cobertas com polivinilpirrolidona, sendo preparado em diferentes concentrações para formar o gradiente necessário de separação espermática. Para a diluição do Percoll<sup>®</sup>, é utilizado o meio SP-TALP, obtendo-se soluções de Percoll<sup>®</sup> 90% e Percoll<sup>®</sup> 45%. No fundo de um tubo de ensaio, são colocados 2 mL da solução de Percoll<sup>®</sup> 90% e, sobre essa solução, adicionam-se, lentamente, 2 mL de Percoll<sup>®</sup> 45%, sem permitir homogeneização entre as duas soluções. O conteúdo de uma palheta de sêmen descongelado (500 µL) é depositado na superfície da solução de Percoll<sup>®</sup> 45% e, a seguir, o conjunto Percoll<sup>®</sup> 45%, Percoll<sup>®</sup> 90% e sêmen é centrifugado a 700g, por 30 min. Em seguida, remove-se o sobrenadante com pipeta, deixando-se apenas o pellet, o qual, contendo os espermatozoides viáveis, é colocado em um novo tubo com 10 mL de TALP e centrifugado em rotação de 700 a 900g, por 10 min. Após essa segunda centrifugação, o sobrenadante é removido e os espermatozoides são suspensos em 500 µL de Fert-TALP. Dentre estas técnicas, o gradiente de Percoll tem sido a mais utilizada (CARVALHO et al., 2008).

Alguns glicosaminoglicanos presentes no trato genital feminino são responsáveis pela indução da capacitação espermática *in vivo*. Nos processos *in vitro*, um glicosaminoglicano, a heparina, tem sido utilizada para capacitação espermática. O mecanismo pelo qual a heparina atua nesse processo ainda não é conhecido por completo, mas parece estar envolvido no desencadeamento de mudanças bioquímicas na membrana plasmática do espermatozoide (GONÇALVES et al., 2008).

O sêmen utilizado na FIV pode ser fresco ou congelado-descongelado. O sêmen fresco é utilizado normalmente quando há a disponibilidade de machos de fertilidade comprovada e que estão disponíveis para a colheita. Já o sêmen congelado-descongelado é mais utilizado por dispensar a colheita de sêmen, a cada realização de FIV (HOLM et al., 1991).

Pode-se ainda optar pela utilização do sêmen sexado, que permite uma redução no tempo para atingir alguns objetivos, tais como, a melhoria da qualidade e quantidade dos animais do rebanho (OSES et al., 2009). Segundo Tanno (2009), é esperado um aumento no ganho genético em até 15%, quando comparado à

utilização do sêmen convencional. Uma alternativa é a utilização do sêmen reverso (sêmen sexado a partir de amostras de sêmen congelado convencional).

A capacitação espermática é dependente de algumas etapas, necessárias antes dos espermatozoides penetrarem nos oócitos; são elas: capacitação, penetração do complexo cumulus, ligação com a zona pelúcida, reação acrossômica, ligação secundária com a zona pelúcida, penetração da zona pelúcida, entrada no espaço perivitelíneo, ligação e fusão com a membrana plasmática seguida pela ativação do oócito. O sistema de reconhecimento e fusão oócito-espermatozoide mediado por um dinâmico processo de modificações protéicas e interações na membrana plasmática (TOPFER-PETERSEN et al., 2000).

Dessa forma, a capacitação espermática ocorre pela remoção dos fatores decapacitantes, presentes no plasma seminal, sendo, basicamente, proteínas e outras substâncias que recobrem a membrana do espermatozoide. As principais alterações que ocorrem nesse processo são bioquímicas e se constituem na remoção do colesterol, a qual eleva a fluidez da membrana espermática, a entrada de  $Ca^{2+}$  na célula espermática, a concentração de AMP cíclico (Apud SINGH et al., 1978) e induz alterações de atividades enzimáticas envolvidas no mecanismo de transdução de sinais que irão desencadear a reação acrossômica (WHITE; AITKEN, 1989). E, para completar o processo de capacitação, os espermatozoides hiperativados se ligam, por meio de receptores da membrana plasmática, a proteínas específicas na zona pelúcida do oócito, de maneira a induzir a reação acrossômica (FLORMAM; FIRST, 1988). Esta, por sua vez, é um processo de exocitose que libera enzimas hidrolíticas, facilitando a penetração do espermatozoide na zona pelúcida e modificando as membranas da região pós-acrossomal, sítio da interação entre oócito e espermatozoide (SIDHU; GURAYA, 1989).

### **2.5.1. Meios capacitantes**

O meio mais utilizado para a capacitação espermática é o Defined Modified-Hepes, denominado DM-Hepes (BRACKETT; OLIPHANT, 1975). Outros meios, comumente, utilizados são os meios TCM 199, Tyrode's Hepes ou SOF (Fluido Sintético de Oviduto), acrescidos, na maioria das vezes, de soro de ovelha em estro ou metaestro (CROZET et al., 1987).

O meio de capacitação espermática contém normalmente de 2 a 10% soro de ovelha em estro (SOE), que promove a remoção da membrana de colesterol dos espermatozoides, favorecendo sua capacitação e, posterior, fecundação (BALDASSARRE et al., 2003; COGNIÉ et al., 2004). Além disso, pode-se utilizar 5 µg/mL de heparina como agente capacitante (COGNIÉ et al., 2004). Pode-se utilizar, ainda, a cafeína, já que esta aumenta e prolonga a motilidade dos espermatozoides de mamíferos (NIWA; OGHODA, 1998; CAMPBELL et al., 2009).

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é uma substância branca, cristalina e inodora, sendo mais encontrada no café e na semente de cacau (IARC, 1991). Além disso, ela é considerada um inibidor da fosfodiesterase, o que promove um aumento da concentração do AMPc (adenosina monofosfato cíclico) durante o processo de capacitação espermática, modulando a adenil ciclase e a reação acrossômica (NASCIMENTO, 2003). Ela é capaz de aumentar a taxa de penetração de sêmen em oócitos, promover a mobilidade dos espermatozoides e induzir a reação acrossômica (KANO et al., 1994).

Em bovinos, a cafeína promove um aumento e manutenção da respiração e a motilidade dos espermatozoides (GARBERS et al., 1971; BALL et al., 1983; EL-GAAFARY, 1994). Spalekova et al. (2011), avaliaram um aumento considerável na motilidade dos espermatozoides de carneiros quando tratados com a concentração de 4 mM de cafeína. Já Baruselli (1993), trabalhando com a concentração de 5 mM de cafeína e 10 mg de heparina no sêmen de búfalo, aumentou a porcentagem de capacitação e poder fecundante dos mesmos. Esse aumento na capacidade fecundante pode estar relacionado ao fato de que, quando se aumenta a concentração de cafeína no meio, eleva-se também a penetração oocitária pelos espermatozoides (FUNAHASHI; NAGAI, 2001). Em coelhos, concentrações mais elevadas de cafeína (5-10 mM) promoveram de forma benéfica a reação acrossômica dos espermatozoides (EL-GAAFARY, 1994). Em suínos (NAGAI et al., 1993) e murganhos (FRASER, 1979), a adição de cafeína promoveu a capacitação e reação acrossomal, além da aceleração da penetração espermática. Porém, níveis elevados de cafeína (superiores a 5 mM) em algumas espécies podem ter efeitos prejudiciais ao sêmen, tais como em humanos.

## **2.6. Fecundação *In Vitro* (FIV)**

Segundo Prestes e Alvarenga (2006), o processo de fecundação marca o início do período embrionário de pré - implantação, caracterizado por uma sucessão de divisões celulares mitóticas, até a ocorrência da primeira diferenciação celular no estágio de blastocisto e a liberação da zona pelúcida.

A qualidade dos oócitos e dos espermatozoides utilizados é de extrema importância para a FIV (CARVALHO NETO, 2009). Além disso, a integridade da zona pelúcida do oócito é essencial para determinar a habilidade espermática *in vitro* na FIV (WINDSOR, 1997). Por isso, o sêmen utilizado influenciará os índices de fecundação após a FIV e, conseqüentemente, os índices de desenvolvimento embrionário (FUKUI et al., 1988).

O meio base mais utilizado para a FIV é o meio TALP, sendo 7,8, o pH ótimo para a fecundação, e 6 a 24 horas o tempo necessário para a co-incubação dos oócitos e espermatozoides, de acordo com os protocolos de cada laboratório (GORDON, 1994; GARCIA et al., 2005). Algumas alternativas de meios para fecundação podem ser compostos de piruvato, lactato, PHE (penicilamina, hipotaurina, epinefrina), heparina e amicacina, meios definidos ou semi definidos como BSA ou FCS ou, ainda, em cocultivo com células tubárias ou da granulosa (GARCIA-GARCIA et al., 2006). O meio, comumente utilizado para o cultivo é o meio SOF, acrescido de aminoácidos e BSA, que se assemelha ao ambiente intra tubário na fase inicial do desenvolvimento embrionário (COGNIÉ et al., 2004). Utilizando este meio, os oócitos submetidos à FIV são transferidos (Dia 0) e mantidos em pequenas gotas, cobertas por óleo mineral a 39°C, em atmosfera úmida, a 5% de CO<sub>2</sub>, 5 a 7% de O<sub>2</sub> e 88 a 90% de nitrogênio, por 7 a 8 dias, para posterior avaliação do desenvolvimento embrionário e capacidade de eclosão *in vitro* (GARCIA-GARCIA et al., 2006; PEREIRA-BONNET et al., 2008). Posteriormente (Dia 2), suplementa-se com FCS, com o intuito de promover uma maior viabilidade dos embriões pós-transferência, podendo o meio ser trocado a cada dois dias (HOLM et al., 1996).

Com a fusão do espermatozoide ao oócito, ocorre a ativação, evidenciada pela exocitose dos grânulos corticais e retomada da meiose. O núcleo espermático se descondensa e transforma-se no pró-núcleo masculino. Este, por sua vez, migra para o centro do oócito, o envelope nuclear se desintegra e ocorre a associação dos cromossomos para a primeira divisão mitótica, ou seja, a clivagem. Inicia-se o

desenvolvimento embrionário por sucessivas divisões e alterações morfológicas para a formação de mórulas e blastocistos (YANAGIMACHI, 1994).

De acordo com estudos realizados por Cognié et al. (2004), tem-se observado que muitos embriões que clivam precocemente, apresentaram baixas taxas de desenvolvimento na produção *in vitro*.

Kharche et al. (2005), utilizando meio TALP, conseguiram uma taxa de fecundação de 54,41% para caprinos. Já Cox e Alfaro (2007), utilizando o mesmo meio, obtiveram uma taxa de fecundação para cabras e ovelhas de 85,5% e 76%, respectivamente.

## **2.7. Fatores que influenciam a PIV**

A PIV aplicada a pequenos ruminantes é uma biotécnica que vem avançando rapidamente, com inúmeros estudos voltados para suas etapas (MIV, FIV e CIV).

Alguns fatores podem limitar o sucesso da técnica, como, por exemplo, o fluxo de aspiração e o diâmetro da agulha de punção, que afetam a recuperação oocitária (GIBBONS et al., 2008), protocolos mais adequados de MIV, FIV e CIV. Além disso, faz-se necessário o conhecimento exato das exigências, tanto fisiológicas quanto metabólicas do oócito e do espermatozoide, bem como o aprimoramento de novos meios de maturação e de cultivo visando estabelecer protocolos que forneçam condições mais ideais para aumentar a viabilidade da PIV. Outro fator limitante da técnica é a qualidade embrionária, que irá implicar numa subsequente gestação, desenvolvimento fetal e nascimento de crias saudáveis (VARAGO, et al., 2008).

A etapa do CIV em ovinos leva a uma redução de 15 a 25% da viabilidade dos embriões quando comparada *in vivo*, implicando numa sobrevivência pós-transferência de taxas abaixo de 50%. Porém a PIV propicia um aumento considerável de crias a partir de uma única fêmea (BERNADI, 2005).

Dessa forma, com os avanços dessa técnica, a sua aplicação limita-se a análise custos/benefícios para cada situação, variando pelas condições monetárias do produtor. O emprego da PIV também se justifica e se adequa a condições em que fêmeas de alto valor genético não têm possibilidades de levar uma gestação a termo, são inférteis. Apesar da PIV aplicada a pequenos ruminantes ser um procedimento oneroso em comparação a PIV em bovinos, já que os primeiros resultados em termos de PIV comercial em ovinos no Brasil ocorreram em 2008

(BASSO et al., 2008), a produção em larga escala se expande com o aumento do número de crias provenientes de uma única doadora (BASSO et al., 2008).

### 3. JUSTIFICATIVA

É necessária uma compreensão das exigências metabólicas e fisiológicas dos oócitos e dos espermatozoides para a obtenção de boas taxas de MIV e FIV. Assim, é imprescindível a realização de novas pesquisas para que se consiga uma condição ideal para MIV de oócitos e para que estes possam ser fecundados. Nesse contexto, as vitaminas antioxidantes têm sido consideradas importantes para complementar os meios *in vitro*, especialmente, o alfa tocoferol (vitamina E), estando seus resultados positivos condicionados às concentrações utilizadas.

Visando, ainda, reduzir a polispermia, melhorar as taxas de FIV e as taxas de desenvolvimento embrionário, relatos têm apontado, em diversas espécies, a cafeína como promotor de capacitação espermática, quando utilizada no meio de FIV. Contudo, existe uma carência de informações relacionadas à utilização da cafeína e de vitamina E nas diferentes etapas da PIV de embriões ovinos.

Diante do exposto, verifica-se a importância de solucionar entraves na produção *in vitro* de embriões ovinos, fazendo-se necessárias novas pesquisas com relação à melhoria das condições dos meios de MIV, FIV e CIV. O melhor desempenho e otimização da PIV levará, conseqüentemente, a um aumento na produção quantitativa e qualitativa de embriões, podendo levar, assim, a uma maior difusão dessa técnica aplicada a pequenos ruminantes no Semiárido Nordeste, levando a uma redução dos custos da PIV entre os produtores. Além disso, a PIV é uma ferramenta que auxilia na conservação de recursos biológicos, para a reprodução de espécies ameaçadas de extinção ou de fêmeas geneticamente superiores incapazes de se reproduzirem de maneira natural, produzindo embriões de qualidade para posterior transferência ou criopreservação.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo geral

- Avaliar o efeito da inclusão de cafeína e de vitamina E na produção *in vitro* de embriões ovinos.

### 4.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da inclusão de vitamina E no meio MIV sobre:
  - A taxa de maturação oocitária *in vitro* de CCO ovinos;
  - A qualidade de CCO ovinos após o processo de maturação *in vitro*.
  
- Avaliar o efeito da inclusão de cafeína no meio de capacitação espermática sobre:
  - A taxa de fecundação oocitária ovina.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. Aspectos éticos**

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIVASF e pelo Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas – CEDEP/UNIVASF, sob o protocolo de número 0004/040713.

### **5.2. Local de execução**

O experimento foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal (LAFIBRA), no Campus Ciências Agrárias da UNIVASF, em Petrolina-PE.

### **5.3. Produção *in vitro* de embriões (PIV)**

#### **5.3.1. Colheita e seleção dos oócitos**

Foram utilizados ovários ovinos obtidos do Abatedouro Municipal em Petrolina-PE, imediatamente após o abate de ovelhas Sem Padrão Racial Definido (SPRD). Os ovários foram transportados até o LAFIBRA, dentro de 1 hora, em solução de NaCl 0,9% acrescido de antibiótico (penicilina), a uma temperatura de 33° a 35°C, em garrafas térmicas. No LAFIBRA, os ovários foram lavados, três vezes, na mesma solução de transporte aquecida, retirados os tecidos adjacentes e mantidos em banho-maria, a 34°C. Para a colheita dos CCOs, foi utilizada uma bomba de vácuo a uma pressão de 10 mL/min, agulha 18G e o meio de recuperação TALP-HEPES (TCM199 com 25 mM HEPES, suplementado com 50 UI heparina/mL, 50 µg de gentamicina/mL e 10% (v/v) de soro fetal bovino). Logo após a colheita, a solução contendo os CCOs foi vertida em placas de petri de 100 mm, analisados sob estereomicroscópio e qualificados de acordo com Gonçalves et al. (2008), sendo selecionados para a MIV apenas os de Graus I e II.

Figura 4 - Ovários em banho Maria à 34°C.



Fonte: Arquivo Pessoal.

Figura 5 – Punção dos ovários com bomba a vácuo.



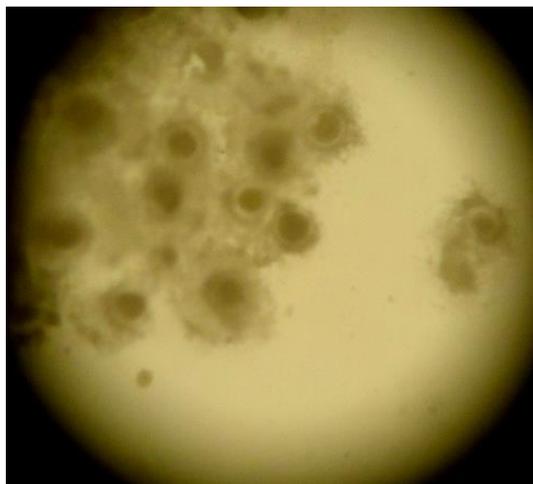
Fonte: Arquivo Pessoal.

### 5.3.2. Maturação *in vitro* (MIV)

Após a classificação oocitária, os CCOs de melhor qualidade eram, inicialmente, mantidos em fluido folicular e, em seguida, banhados em meio de seleção oocitária composto por TCM-199, suplementado com 2,2 mg de bicarbonato de sódio, 0,2 mM de piruvato, 1% de sulfato de gentamicina e 10% de soro fetal bovino (SFB) para, em seguida, serem direcionados à MIV. O total de CCOs selecionados foi igualmente dividido em quatro grupos de maturação, onde os do Grupo VE0 (Sem vitamina E) foram imersos em meio composto de TCM-199, suplementado com 2,2 mg de bicarbonato de sódio, 20 µg/mL de FSH/ LH, 10 ng/mL de EGF e 10%(v/v) de SOE. Já nos Grupos VE50, VE100 e VE200, foi utilizado o mesmo meio de maturação utilizado no Grupo VE0, adicionado a 50 µM, 100 µM e 200 µM de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), respectivamente. Os CCOs foram dispostos em placa de quatro poços, utilizando no meio da placa, água Mili-Q, durante 24 horas, em estufa de cultivo, a 38,5°C, em uma atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>.

Ao final do processo, para avaliação da MIV os CCOs foram classificados em: (1) maduros com expansão das células do *cumulus* e expulsão do 1º corpúsculo polar (CP); (2) imaturos com expansão das células do *cumulus*, mas sem expulsão do 1º CP; e (3) imaturos sem expansão das células do *cumulus* e sem expulsão do 1º CP. Os oócitos considerados maduros foram ainda classificados de acordo com sua morfologia quanto ao grau de retração (presença ou ausência), coloração do ooplasma (homogêneo, levemente heterogêneo e heterogêneo) e picnose (presença ou ausência). Foram destinados à FIV aqueles avaliados como maduros com expansão das células do *cumulus*, expulsão do 1º corpúsculo polar e de qualidade morfológica.

Figura 6 - Oócitos maturados em meio MIV com presença de vitamina E.



Fonte: Arquivo Pessoal.

### 5.3.3. Fecundação *in vitro* (FIV)

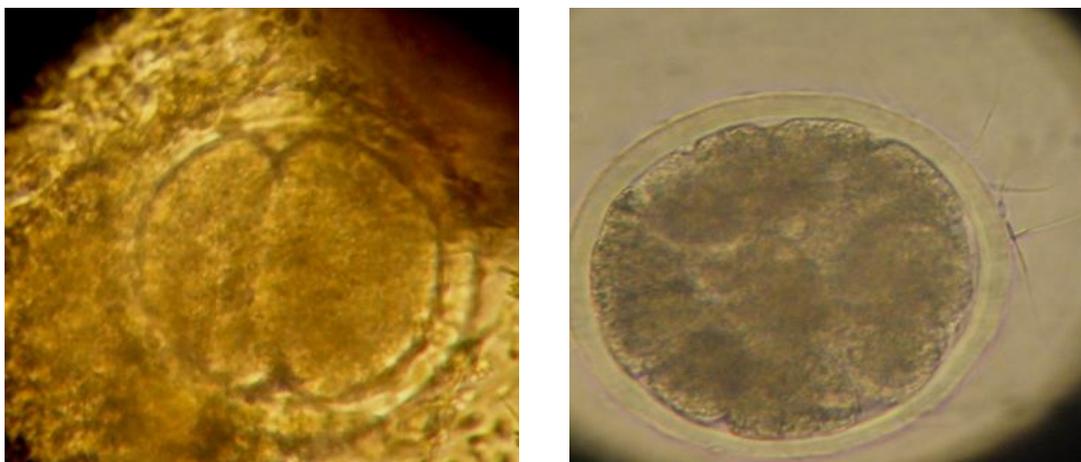
O sêmen utilizado na FIV foi colhido usando vagina artificial de carneiro de fertilidade comprovada. Este sêmen foi disposto em cima de uma coluna de gradiente de Percoll 45%/90%. Os espermatozoides móveis foram recuperados por duas centrifugações, a primeira a 700G, por 15 minutos e a segunda por 100G por 5 minutos. A concentração espermática foi ajustada para  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL no volume total de 500  $\mu$ L/ gota.

Os CCOs maturados seguiram para FIV, onde foram subdivididos em: Grupo C0 (fecundados sem cafeína) e Grupo C5 (fecundados com 5 mM cafeína), C10 (com 10 mM de cafeína) e C20 (com 20 mM de cafeína). No Grupo C0, os CCOs maduros foram incubados com os espermatozoides selecionados em SOF-FIV, contendo 40  $\mu$ g/mL de sulfato de gentamicina, 10% de SOE e 1 mg/mL de heparina; enquanto nos Grupos C5, C10 e C20 foi utilizado o mesmo meio daquele utilizado no Grupo C0, porém acrescido de 5 mM, 10 mM e 20 mM de cafeína. A FIV foi realizada por um período de 22 horas, em incubadora, a 38,5°C, com atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

### 5.3.4. Avaliação dos presumíveis zigotos

Os embriões foram avaliados com auxílio de um microscópio invertido para avaliação quanto à presença dos dois corpúsculos polares e/ou os dois pró-núcleos, após centrifugação a 12100G por 30 min.

Figura 7 – Embriões em estágios de clivagem (Fonte: Arquivo Pessoal, 2015).



#### **5.4. Parâmetros avaliados**

Foram registradas as seguintes variáveis: Número de CCOs maduros; taxa de maturação oocitária [(número de CCOs maduros/número de CCOs submetidos à MIV) x 100]; Proporção de oócitos (1) maduros com expansão das células do *cumulus* e expulsão do 1º corpúsculo polar (CP); (2) imaturos com expansão das células do *cumulus*, mas sem expulsão do 1º CP; e (3) imaturos sem expansão das células do *cumulus* e sem expulsão do 1º CP; Proporção de oócitos maduros com e sem retração; Proporção de oócitos maduros com e sem picnose; Proporção de oócitos maduros com ooplasma de coloração homogênea, levemente heterogênea e heterogênea. O número de presumíveis zigotos; A taxa de fecundação oocitária [(número de presumíveis zigotos/número de CCOs submetidos à FIV) x 100].

#### **5.5. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão ou em percentagem. Para comparação dos parâmetros, entre os grupos, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) *one-way*, seguida da realização do teste de Tukey. Os dados em porcentagem foram submetidos ao Teste de Fisher ou Qui-quadrado, por meio do software estatístico ASSISTAT (2011). As comparações foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

Não foi observada diferença estatística ( $P>0,05$ ) com relação à taxa de maturação oocitária e a de retração e picnose dos oócitos maturados de ovinos, entre grupos de suplementação com diferentes concentrações de vitamina E em meio de maturação, como mostra a Tabela 5.

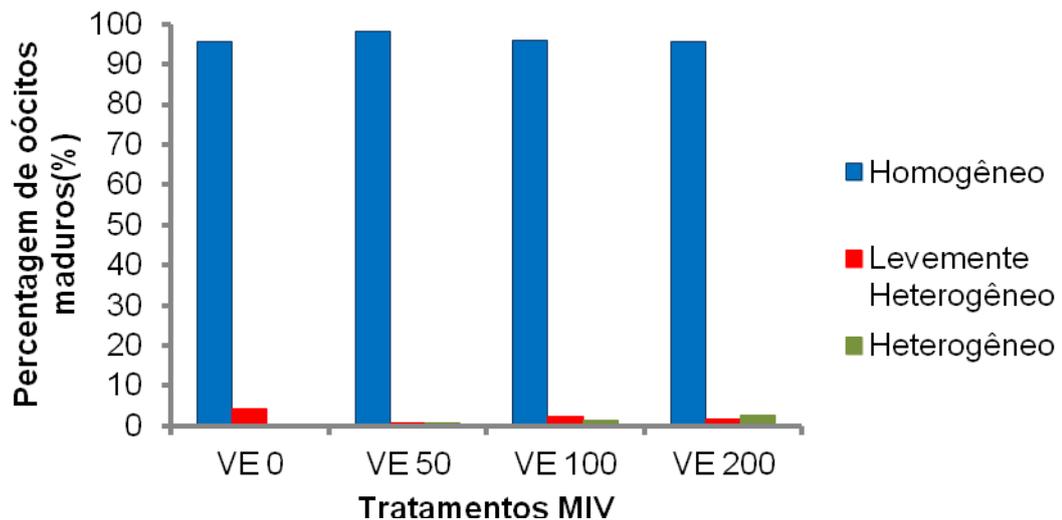
Tabela 5 – Taxa de maturação oocitária (%) e percentual (média  $\pm$  EPM) de oócitos com retração e picnose após maturação *in vitro* sob diferentes concentrações de Vitamina E (VE0 = 0  $\mu$ M; VE50 = 50  $\mu$ M; VE100 = 100  $\mu$ M; VE200 = 200  $\mu$ M).

Grupos	Oócitos maturados	Taxa de maturação (n)	Retração	Picnose
VE0	329	62,92 $\pm$ 9,19 (207)	0,97 $\pm$ 0,20 (2/207)	3,38 $\pm$ 0,21 (7/207)
VE50	334	67,47 $\pm$ 7,87 (222)	3,60 $\pm$ 0,39 (8/222)	2,70 $\pm$ 0,27 (6/222)
VE100	334	60,17 $\pm$ 9,56 (201)	2,49 $\pm$ 0,27 (5/201)	1,99 $\pm$ 0,30 (4/201)
VE200	326	56,75 $\pm$ 9,92 (185)	1,08 $\pm$ 0,20 (2/185)	1,62 $\pm$ 0,21 (3/185)

$P>0,05$ .

No tocante ao percentual de homogeneidade da coloração do ooplasma dos oócitos maturados *in vitro* com diferentes concentrações de vitamina E, não foi observada diferença significativa entre os grupos ( $P>0,05$ ), porém, o grupo VE100 apresentou oócitos com coloração heterogênea. Através dessa avaliação, também foi observado que, dentro de cada tratamento, houve o predomínio significativo ( $P<0,05$ ) de complexos cumulus oócitos homogêneos quando comparados às demais categorias (levemente heterogêneos e heterogêneos) (Figura 4).

Figura 8 – Percentual de homogeneidade da coloração do ooplasma (homogêneo, levemente heterogêneo e heterogêneo) de complexos cumulus oócitos (CCOs) ovinos, maturados *in vitro* sob diferentes concentrações de Vitamina E (VE0 = 0 µM; VE50 = 50 µM; VE100 = 100 µM; VE200 = 200 µM).



P>0,05.

Como apresentado na Tabela 6, o uso de 5 mM (C5) de cafeína como promotor de capacitação espermática de sêmen ovino para a FIV reduziu, estatisticamente, (P<0,05) a taxa de fecundação oocitária quando comparada ao grupo controle (C0).

Tabela 6 – Taxa de fecundação oocitária (% médio) de complexos cumulus oócitos (CCOs), fecundados por espermatozoides ovinos capacitados *in vitro* sob diferentes concentrações de Cafeína (C0 = 0 mM; C5 = 5 mM; C10 = 10 mM; C20 = 20 mM).

Grupos	N	Taxa de fecundação (%)
CF0	143	15,38 ± 0,44 (22/143) <sup>a</sup>
CF5	175	3,43 ± 0,29 (6/175) <sup>bc</sup>
CF10	168	8,93 ± 0,80 (15/168) <sup>ac</sup>
CF20	175	4,00 ± 0,43 (7/175) <sup>a</sup>

a, b, c Valores com letras sobrescritas diferem estatisticamente entre linhas (P<0,05).

## 7. DISCUSSÃO

Nesse estudo nós avaliamos o efeito da adição de diferentes concentrações de vitamina E ao meio de maturação e de cafeína ao meio de fecundação de oócitos destinados à produção *in vitro* de embriões ovinos.

A vitamina E, quando adicionada ao meio de cultivo *in vitro* no desenvolvimento de embriões de ratos, foi capaz de promover um aumento na taxa de sobrevivência dos mesmos (STEELE; JEFFERY; DIPLOCK, 1974; ARÉCHIGA; EALY; HANSEN, 1994; TAO et al., 2004).

Nossos resultados corroboram com os encontrados por Natarajan et al. (2010), que, testando em meio MIV, diferentes concentrações de  $\alpha$ -tocoferol em oócitos ovinos, não observaram efeito significativo entre os grupos. O mesmo foi observado por Guemra et al. (2013), usando quercetina como antioxidante na maturação de oócitos bovinos.

A ausência de diferença estatística da taxa de maturação no presente estudo pode ser atribuída à escolha do tipo de meio de maturação base que foi utilizado nos grupos experimentais (TCM 199) e sua suplementação. Esse meio possui uma rica composição (aminoácidos, sais minerais e vitaminas), além de ter sido suplementado com piruvato, bicarbonato, FSH, LH, estradiol ( $E_2$ ), soro fetal bovino (SFB) e fator de crescimento epidermal (EGF) (COCERO et al., 2011). Assim, este meio pode ter proporcionado condições semelhantes de maturação, independentemente do acréscimo de vitamina E aos meios. Martínez et al. (1993) confirmaram esse fato quando encontraram excelentes resultados na taxa de maturação de oócitos suínos em TCM 199, quando comparados àqueles obtidos com NCSU23 como meio de maturação, ambos suplementados com fluido folicular e diferentes concentrações de hormônios, EGF, gonadotrofina coriônica humana e equina (hCG e eCG).

Outro ponto que pode ter auxiliado o grupo controle (VE0) a manter taxas de MIV semelhantes às dos demais grupos de tratamento foi a presença de EGF, que possui como principal efeito o estímulo da síntese de glutatona intracelular oocitária e, conseqüentemente, resulta na proteção do DNA, melhorando a síntese de

proteínas e aminoácidos, regulando a maturação através do estímulo para a quebra da vesícula germinativa e expansão das células do cumulus (WHITAKER; KNIGHT, 2004).

A suplementação de diferentes substâncias aos meios de maturação é uma prática rotineira de laboratórios de PIV. SFB é utilizado como fonte proteica (MINGOTI et al., 2011; GUÉRIN et al., 2001). O estradiol (E<sub>2</sub>) é outra substância acrescida em alguns protocolos de MIV, embora seus efeitos na MIV ainda não são bem explicados (COGNIÉ et al., 2004). Também é sabido que as gonadotrofinas hipofisárias (FSH e LH) atuam na indução da maturação nuclear (MOOR; TROUNSON, 1977), na expansão das células da granulosa (CHOI et al., 2001) e melhorando, assim, a qualidade embrionária (GALLI; MOOR, 1991). Ao TCM 199, tem sido feita ainda a adição de antioxidantes, como cisteamina que tem melhorado a aquisição da competência oocitária, culminando em elevadas taxas de desenvolvimento e qualidade embrionária (MATOS et al., 2002). Isso porque a cisteamina estimula o aumento da concentração de glutathione do oócito, melhorando a maturação nuclear, por meio do equilíbrio das concentrações de radicais livres, reduzindo, assim, seus danos sobre a célula.

Dalvit et al. (2005), trabalhando com oócitos bovinos, observaram que, durante o processo de MIV, os níveis de vitamina E reduzem naturalmente, devido à presença de peróxidos lipídicos presentes no meio, necessitando, dessa forma, de outras substâncias que mantenham a atividade do  $\alpha$ -tocoferol alta e constante, como, por exemplo, o uso do ácido ascórbico. Isto pôde ser ratificado através dos dados encontrados por Miclea et al. (2010), os quais, usando a combinação da vitamina E com a vitamina C, conseguiram promover um aumento nas taxas de maturação oocitária.

A vitamina E tem seu potencial antioxidante por um curto intervalo de tempo, reagindo rapidamente com os EROs e radicais livres. Desse modo, tem sido feitas associações das concentrações de vitamina C e vitamina E, e tem-se tido melhores resultados. Esses efeitos positivos podem ser justificados em razão da capacidade da vitamina C de promover regeneração das moléculas de vitamina E, que seriam alteradas pelos radicais livres, preservando, assim, a vitamina e, conseqüentemente, seu efeito antioxidante (CHOW; TAPPEL, 1972).

As EROs podem ser formadas a partir do oxigênio, mas podem ser originadas também de outros tipos de elementos, como nitrogênio, carbono ou enxofre (SILVA

et al., 2011). O estresse oxidativo é consequente de um desequilíbrio na quantidade dessas EROs, podendo causar efeitos deletérios sobre a função celular, conduzindo aos danos oxidativos dos componentes intracelulares, os quais podem ocasionar a apoptose (GUERIN; MOUATASSIM; MENEZO, 2001). Então, visando reduzir esses efeitos, tem-se testado diferentes quantidades de antioxidantes para equilibrar a formação das EROs e manter as funções fisiológicas dos oócitos na MIV (ANDRADE et al., 2010; GUEMRA et al., 2013).

Assim, a adição de vitamina E não afetou negativamente a taxa de maturação e desenvolvimento oocitário devido às baixas concentrações das EROs. Apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas com a adição da vitamina E, pôde-se observar que esta não promove danos celulares nas concentrações utilizadas nesse estudo. As porcentagens de oócitos que apresentaram retração e picnose variaram de 1,77% a 4,81% e de 2,65% a 3,85%, respectivamente. Importante ressaltar que, mesmo não havendo efeito da inclusão de vitamina E nos meios de MIV no tocante ao grau de homogeneidade de coloração, dentro de cada grupo de tratamento, comparando as categorias de homogeneidade, sempre houve predomínio dos CCOs de coloração homogênea. Tais parâmetros morfológicos estão, diretamente, correlacionados com a qualidade da célula, pois são antecessores da apoptose celular e/ou consequente degeneração, como mostra trabalho realizado por Grivicich, Regner e Brondani da Rocha (2007). De acordo com Carneiro (2002), os padrões morfológicos dos oócitos apresentam grandes variações entre as espécies. Os oócitos de ruminantes apresentam ooplasma claro e quase ausente de granulações quando comparados àqueles equinos, suínos e caninos, os quais possuem ooplasma escuro e com granulações, estando essas diferenças correlacionadas com a quantidade e à distribuição dos lipídeos citoplasmáticos. Gonçalves et al. (2008) relataram que os oócitos com maior potencial para retomada da meiose devem apresentar ooplasma homogêneo.

No tocante aos dados de FIV, a capacitação espermática *in vitro* pode ser induzida em várias espécies através da incubação dos espermatozoides em meios definidos, suplementados com substâncias que minimizam a composição eletrolítica dos fluidos do trato reprodutivo da fêmea. Estes meios são compostos por fontes energéticas, como o piruvato, lactato e glicose; uma fonte proteica, como a albumina; bem como bicarbonatos de sódio e cálcio, além de heparina e soro de fêmea em estro (VISCONTINI et al., 1998).

Existe uma relação entre as alterações que ocorrem na morfologia do acrossoma com potencial fecundante e motilidade dos espermatozoides (SAACKE; MARSCHALL, 1968). Dentre elas, estão mudanças intracelulares, como o efluxo de colesterol, aumento da fluidez da membrana plasmática, concentrações de cálcio e AMPc, fosforilação das proteínas quinases e mudanças na motilidade (BREITBART, 2002).

Os peptídeos como a adrenalina, adenosina, calcitonina e as substâncias derivadas da metilxantina, tais como a teofilina, pentoxifilina e a cafeína, podem estimular e regular a capacitação. O mecanismo de ação dessas substâncias é a ativação da adenilato ciclase, que é conhecida como o primeiro mensageiro e esta, presente na membrana plasmática, convertendo o ATP em AMPc, necessários para a fosforilação das proteínas quinases durante a capacitação. Dessa forma, o uso de tais substâncias poderia resultar numa melhor qualidade do sêmen utilizado em programas de FIV (GOULART et al., 2004; BREININGER; CETICA; BECONI, 2010).

Porém, no nosso estudo, o uso de 5 mM de cafeína promoveu uma redução significativa das taxas de fecundação. Esses dados corroboram com os encontrados por Imoedemhe et al. (1992), trabalhando com espermatozoides humanos na mesma concentração, o que levou a uma redução da motilidade espermática.

A cafeína e a heparina tem sido amplamente utilizada nos meios capacitantes de suínos (MARTINEZ et al., 1993) e bovinos (ANDERSON, 1991), respectivamente. A heparina se mostrou ser um potente glicosaminoglicano para capacitação de espermatozoides bovinos, porém sua ação capacitante não diferiu daquela verificada ao utilizar a concentração de 10 mM e 20 mM de cafeína (PARRISH et al., 1988), a qual, por sua vez, melhorou a taxa de penetração espermática quando comparada com a concentração de 5 mM. Já Valdebenito (2007), trabalhando com espermatozoides de peixes, verificou que a cafeína na concentração de 20 mM tem a capacidade de prolongar a motilidade dos espermatozoides e este efeito é atribuído à inibição da enzima fosfodiesterase pela cafeína, permitindo a acumulação dos nucleotídeos cíclicos, especialmente o AMPc intracelular, conduzindo, assim, a um aumento da atividade flagelar (AITKEN et al., 1983; MORISAWA, 1994).

Talvez, a cafeína na menor concentração usada no presente trabalho não tenha sido suficiente para promover um aumento da concentração de AMP cíclico durante a capacitação, já que, em estudo realizado por Funahashi e Nagai (2001),

foi demonstrado que a cafeína induz a capacitação em sêmen fresco de suínos e aumenta a penetração de espermatozoides.

Estudos também têm demonstrado que, devido à rápida ação da cafeína sobre a aquisição da capacitação/reação de acrossomados espermatozoides, a sua suplementação no meio aumenta as taxas de poliespermia, prejudicando, substancialmente, a produção de embriões (ABEYDEERA; DAY, 1997; FUNAHASHI; NAGAI, 2001).

Os resultados mostraram que a cafeína não aumentou as taxas de fecundação quando utilizada no meio FIV para promover a capacitação espermática. Isso pode estar relacionado ao fato da cafeína causar aumento de AMPc de forma desregulada pela inibição da fosfodiesterase, uma vez que o AMPc atinge um limiar intracelular, isso pode ativar reações acrossômicas espontâneas (FRASER et al., 2007). Apesar disso, Martino et al. (1994) e Palomo et al. (1998) apresentaram taxas de fecundação semelhantes as encontradas no presente estudo. Onde tais estudos indicam que mesmo o sêmen sendo coletado de machos com fertilidade comprovada não terem sido eficazes para promover a fecundação nos oócitos, provavelmente devido aos espermatozoides não terem sido capacitados eficientemente e não terem uma reação acrossômica normal nas condições experimentais ou ainda serem atribuídas a causas relacionadas ao oócito, como uma deficiente maturação citoplasmática, levando então a um atraso na penetração dos espermatozoides. As baixas taxas de FIV podem ser atribuídas também a falta de descondensação da cabeça do espermatozóide que foi observado nesses trabalhos em alguns dos oócitos fertilizados, sendo isso resultado da ausência do factor de crescimento pró-núcleo masculino citoplasmático (mPGF) responsável pela formação do pronúcleo masculino.

## 8.CONCLUSÕES

Em conclusão, a vitamina E promoveu as mesmas taxas de maturação *in vitro* de oócitos ovinos que o meio base (controle). Além disso, a vitamina E manteve a morfologia normal dos oócitos nas concentrações utilizadas nesse trabalho.

A cafeína, quando utilizada na concentração de 5 mM, reduz as taxas de fecundação *in vitro* de oócitos ovinos.

## 9. REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, R. B.; LIOW, S. L.; RAHMAN, A. N.; CHAN, W. K.; WAN-KHADIJAH, W. E.; NG, S. C. Prolonging the interval from ovarian hyperstimulation to laparoscopic ovum pick-up improves oocyte yield, quality, and developmental competence in goats. **Theriogenology**, v. 70, p. 765-77, 2008.
- ABEYDEERA, L. R.; DAY, B. N. In vitro penetration of pig oocytes in a modified trisbuffered medium: Effect of BSA, caffeine and calcium. **Theriogenology**, v. 48, n. 4, p. 537-544, sep. 1997.
- ARÉCHIGA, C.F.; EALY, A.D.; HANSEN, P.J. Efficacy of vitamin E and glutathione for thermoprotection of murine morulae. **Theriogenology**, v.41, p.1545-1553,1994.
- AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. **Biology of Reproduction**, New York, v. 40, n. 6, p. 183-197, 1989.
- ALCÂNTARA NETO, S. A.; LUZ, V. J.; ANDRADE, L. L. M.; FREITAS, F. J. V. Efeito do método de colheita sobre a taxa de recuperação e a qualidade oocitária em ovinos do Nordeste Brasileiro. **Ciência Animal**. v. 20, p. 97-102, 2010.
- ANDERSON, G.B. Fertilization, early development and embryo transfer. In: CUPPS, P. **Reproduction in Domestic Animals**. 4.ed. San Diego : Academic Press,p.279-313, 1991.
- ANDRADE E.R.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.34, n.2, p.79-85, 2010.
- ANDRIOLI-PINHEIRO A. Métodos de colheita e de inovulação de embriões caprinos (*Capra hircus*, Linnaeus, 1758) e os efeitos de repetidas colheitas na vida reprodutiva de doadoras. 1993. 100f. **Dissertação** (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1993.

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

ANEL, L.; SEVILLANO, C.; ALVAREZ, M.; ALEGRE, B.; ANEL, E.; DOMÍNGUEZ, C.; CARBAJO, M.; DE LA FUENTE, J. Repeated laparoscopic follicular aspiration in lambs. **Theriogenology**, Los Altos, v. 47, p.152, 1997.

ARAÚJO, M. A. J. **Química dos alimentos - Teoria e prática**. 4ª edição, Viçosa - UFV. p. 596, 2008.

AVELAR, S. R. G. Diferentes protocolos de estimulação ovariana para a produção de oócitos em cabras da raça Canindé. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, 2009.

AVELINO, K.B., VANTINI, E., SENEDA, M.M., et al. In vitro production of embryos of cows with acquired infertility. **Theriogenology**, v.57, p.656, 2002.

AVERY, B.; BRANDENHÓFF, H. R.; GREVE, T. Development of in vitro matured and fertilized bovine embryos, cultured from days 1-5 post insemination in either menezob2 medium or in HECM-6 medium. **Theriogenology**, v.44, p.935-945, 1995.

BALDASSARRE, H. Tecnologias reprodutivas de última geração. In: Aisen EG. **Reprodução ovina e caprina**. São Paulo: MedVet. p.179-183, 2008.

BALDASSARRE, H.; FURNUS, C. C.; MATOS, D. G.; PESSI, H. In vitro production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. **Theriogenology**, v.45, p.707-717, 1996.

BALDASSARRE, H.; MATOS, D. G.; FURNUS, C. C.; CASTRO, T. E.; FISCHER, E. I. C.; MATOS, D. G. Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. **Animal Reproduction Science**, v.35, p.145-150, 1994.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; GAUTHIER, M.; NEVEU, N.; LAPOINTE, J.; SNEEK, L.; LEDUC, M.; DUGUAY, F.; ZHOU, J. F.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C. N. Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy.

**Theriogenology**, v.59, p.831-839, 2003.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; KEEFER, C. L.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C. N. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies.

**Theriogenology**. v. 57, p. 275-284, 2002.

BARIL, G. Produção in vivo de embriões caprinos e ovinos. In: Freitas, V. J. F.

**Biotechnologia da reprodução em pequenos ruminantes: produção de embriões por transferência nuclear (clonagem)**. 1ed., Fortaleza: Multicor, cap. 1, p. 7-20, 2006.

BARREIROS, A. L. B. S, DAVID, J. M, DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, p.113-123, 2006.

BASSO, C.A.; MARTINS, J.F.P.; FERREIRA, C.R. Produção in vitro de embriões ovinos: aspectos da técnica de aspiração folicular e do tratamento hormonal de doadoras. **O embrião**, n.38, p.9-13, 2008.

BECKER, A. R. C. L.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. Effect of 17  $\beta$ -estradiol on the in vitro maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.58, p.1663-1673, 2002.

BERNARDI, M. L. Produção in vitro de embriões ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.1-16, 2005.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais Livres e os Principais Antioxidantes da Dieta. **Revista. Nutrição.**, Campinas, v. 12, p. 123-130, 1999.

BORGES, M. S. M. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **(Trabalho de conclusão de curso)**. Jataí: Universidade Federal de Goiás, Medicina Veterinária, 2008.

BORMANN, C. L.; ONGERI, E.M.; KRISHER R.L. The Effect of Vitamins During Maturation of Caprine Oocytes on Subsequent Developmental Potencial *in vitro*. **Theriogenology**, v. 59, p.1373-1380, 2003.

BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; BRISSON, C.; CRBONNEAU, G. C.; DUROCHER, J. In Vitro Production in Cow: An Effective Alternative to the Conventional Embryo Production Approach. **Theriogenology**, v. 51, p. 59-70, 1999.

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

BREININGER, E.; CETICA, P. D.; BECONI, M. T.; Capacitation inducers act through diverse intracellular mechanisms in cryopreserved bovine sperm. **Theriogenology**, Stonehan, v. 74, n.6, p. 1036-1049, 2010.

BREITBART, H. Intracellular calcium regulatuion in sperm capacitation and acrossomal reaction. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, p. 139-144. 2002.

CAAMAÑO, J.N.; RYOO, Z.Y.; YOUNGS C.R. Promotion of Development of Bovine Embryos Produced *in vitro* by Addition of Cysteine and  $\beta$ -Mercaptoethanol to a Chemically Defined Culture System. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p 369-74, 1998.

CAMPBELL, K. H. S.; MAALOUF, W. E.; LEE, J. H. Effects of caffeine, cumulus cell removal and aging on polyspermy and embryo development on in vitro matured and fertilized ovine oocytes. **Theriogenology**, v. 71, p. 1083-1092, 2009.

CARNEIRO, G. F. Maturação *in vitro* de oócitos eqüinos. **Ciência Tecnologia Veterinária**, v.2, p.5-10, 2002.

CARVALHO, J. O.; MACHADO, G. M.; SIQUEIRA FILHO, E.; CAIXETA, E. S.; FRANCO, M. M.; RUMPF, R.; DODE, M. A. N. Different percoll volumes, time and force of centrifugation on in vitro production and sexof bovine embryos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, p. 515, 2008.

- CARVALHO NETO, J. O. Avaliação da qualidade do espermatozoide bovino criopreservado após sexagem por citometria de fluxo e sua utilização na Produção in vitro de embriões. **Tese** (Mestrado). Arquivo da Faculdade de Medicina e Veterinária da Universidade de Brasília, 2009.
- CHOI, Y.H; CARNEVALE, E.M; STEIDEL, G.E; SQUIRES, J; SQUIRES, E.L. Effects of gonadotrophins on bovine oocytes matured in TCM-199. **Theriogenology** , v.56, p.661-670, 2001.
- COELHO, L. A; ESPER, C. R; ALVAREZ, R. H; VANTINI, R; JUNIOR, I. L. A. Produção in vitro de embriões bovinos: Utilização de diferentes fontes gonadotrofinas na maturação dos oócitos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p. 1117-1121, 2002.
- COGNIÉ, Y. State of art in sheep-goat embryo transfer. **Theriogenology**. v. 51, p. 105-116, 1999.
- COGNIÉ, Y.; BARIL, G. Le point sur la production et le transfert d'embryons obtenus in vivo e in vitro chez la bebris e la chèvre. **Journal of Animal Production**, v.15, p. 199-207, 2002.
- COGNIÉ Y.; BARIL, G.; POULIN, N. Current status of embryo technologies in sheep and goat. **Theriogenology**, v.59, p.171-188, 2003.
- COGNIÉ, Y.; POULIN, N.; LOCATELLI, Y.; MERMILLOD, P. State of the production, conservation and transfer of in vitro produced embryos in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.437-445, 2004.
- CORDEIRO, M. F. Avaliação da laparoscopia na aspiração folicular em fêmeas caprinas pré-púberes e adultas com ou sem estimulação ovariana hormonal. 2006. **Tese** (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – UNESP, 2006.
- COX, F. J.; ALFARO, V. In Vitro Fertilization and Development of OPU Derived Goat and Sheep Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 83–87, 2007.

- CROCOMO, F. L.; MARQUES FILHO, C. W.; LANDIM ALVARENGA, C. F.; BICUDO, D. S. Peculiaridades da coleta de oócitos para produção *in vitro* de embriões ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.36, p.25-31, 2012.
- CROSS, N.L., Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v.59, p.7-11,1998.
- CROZET, N.; DE SMEDT, N.; AHMED-ALI, M.; SÉVELLEC, C. Normal development following “*in vitro*” oocyte maturation and fertilizaation in the goats. **Theriogenology**, London, Abstract, v.39, p.206, 1993.
- CROZET, N.; HUNEAU, D.; DESMEDT, V.; THERON, M. C.; TORRÈS, S.; SEVELLEC, C. *In vitro* fertilization with normal development in the sheep. **Gamete Research**. v.16, p.159-170, 1987.
- CZLONKOWSKA, M.; EYSYMONT, U.; KOSSAKOVSKI, M.; DZIAK, J. Birth of lambs after *in vitro* maturation, fertilization and co-culture with oviductal cells. **Development**. v. 30, p. 34-38, 1991.
- 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.
- DE MATOS, D.G; HERRERA, C; CORTVRINDT, R; SMITZ, J; VAN SOON, A; NOGUEIRA, D. Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine *in vitro* embryo production. **Molecular Reproduction Development**, v.62, p.203-202, 2002.
- DEKEL, N. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 234, p. 19-25, 2005.
- DORLAND, M.; GARDNER, D. K.; TROUNSON, A. O. Serum in synthetic oviductal fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.13, p.70, 1994.

- DZIAK, J. Birth of lambs after in vitro maturation, fertilization, and co-culture with oviductal cells. **Molecular Reproduction and Development**, v. 30, p.34-38, 1991.
- EYESTONE, W. H.; BOER, H. A. FSH enhances developmental potencial of bovine oocytes matured in chemically defined medium. **Theriogenology**, v.39, p.216, 1993.
- 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.
- FERREIRA, R. C.; SOUZA, F. M. H. G.; FONSÊCA, R. F. M.; SANVIDO, B. G.; BASSO, C. A.; PONTES, F. H. J.; ERENO JÚNIOR, C. J.; EBERLIN, N. M. Controle de qualidade de meios para Produção *in vitro* de embriões bovinos por “**Controle de Qualidade de Meios para Produção *In Vitro* de Embriões Bovinos por “Fingerprint” Utilizando Espectrometria de Massas com Infusão por Nano-Eletrospray com Chip**”
- FLORMAN, H. M.; FIRST, N. L. The regulation of acrosomal exocytosis 1: Sperm capacitationis required for the induction of acrosome reaction by the bovine zona pellucida in vitro. **Developmental Biology**, v.128, p.453-463, 1988.
- FRASER, L. et al. Dialysys of boar semen prior to freezing-thawing: its effects on post-thaw sperm characteristics. **Theriogenology**, New York, v. 67, n.5, p.994-1003, 2007.
- FREITAS, C. P.; MARTINS JÚNIOR, A.; STRINGHINI, G.; NOBRE, A. F.; BRACKETT, B. G.; SILVA, R. B. Addition of GnRH or FSH for bovine oocyte maturation enable comparable in vitro embryo. **Biology of Reproduction**, v.66, p.308, 2002.
- FUKUI, Y.; GLEW, A. W.; GANDOLFI, F.; MOOR, R. M. Ram-specific effects on in-vitro fertilization and cleavage of sheep oocytes matured in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.82, p. 337- 340, 1988.

GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINI, P.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick-up from live donors. **Theriogenology**, Los Altos, v.55, n.6, p.1341-1357, 2001.

GALLI, C; MOOR, R.M. Gonadotrophin requirement for the in vitro maturation on sheep oocytes and their subsequent embryonic development. **Theriogenology**, v.35, p.1083-1093, 1991.

GARCIA, J. M; AVELINO, K. B; VANTINI, R. Estado da arte da fertilização in vitro em bovinos. **1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, Londrina-PR, Biotecnologia da reprodução em bovinos. UEL, p. 201, 2005.

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: p. 403, 1995.

GARCIA-GARCIA, R. M.; DOMINGUEZ, V.; GONZALEZBULNES, A. Effect of embryo developmental stage and culture conditions on number and quality of ovine in vitro produced blastocysts. **Zygote**, v.14, p.181-187, 2006.

GARDNER, D. K.; LANE, M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? **Human Reproduction Update**, v.3, p.367-382, 1997.

GIBBONS, A.; BONNET, F. P.; CUETO, M. I.; CATALA, M.; SALAMONE, D. F.; GONZALES-BULNES, A. Procedure for maximizing oocyte harvest for in vitro embryo production in small ruminants. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p. 423–426, 2007.

GIBBONS, A.; BONNET, F. P.; CUETO, M. I.; SALAMONE, D.; CATALA, M. Colheita de oócitos guiada por laparoscopia em caprios e ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, p.s223-230, 2008.

GOMEZ, E.; CAAMANO, J.; RODRIGUEZ, A.; DE FRUTOS, C. FACAL, N.; DIEZ, C. Bovine early embryonic development and vitamin A. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 63-71, 2006.

GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.212-217, 2007.

GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M. M.; VISINTIN, J. A.; COSTA, L. F. S. Produção In Vitro de Embriões. In: Gonçalves, P. B. D.; Figueiredo, J. R.; Freitas, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2.ed. São Paulo: Varela, p. 340, 2008.

GORDON, I. Laboratory Production of Cattle Embryos. **Biotechnology in Agriculture** N.11. CAB International, Wallingford, UK, p. 640, 1994.

GOULART, H. M. SILVA, A. E. D. F.; MCMANUS, C.; PAPA, F. O. Efeitos da pentoxifilina sobre a viabilidade in vitro dos espermatozoides de equinos, após o resfriamento a 5°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 33, n. 1, p. 112-122. 2004.

GRAFF, K. J.; MEINTJES, M.; DYER, V. W.; PAUL, J. B.; DENNISTON, R. S.; ZIOMEK, C.; GODKE, R. A. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats. **Theriogenology**. v. 51, p. 1099-1119, 1999.

GRAAF, K. J.; MEINTJES, M.; PAUL, J. B. Ultrasound-guided oocyte recovery from FSH-treated goats for IVF. **Theriogenology**, v.43, p.223, 1995.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; BRONDANI DA ROCHA, A. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GUERIN, P.E.L.; MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v.7, p.175-189, 2001.

GUERIN, S.; MONZANI, P.S.; SANTOS, E.S.; ZANIN, R. OHASHI, O.M. MIRANDA, M.S.; ADONA, P.R. Maturação in vitro de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.6, p.1616-1624, 2013.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. New York, NY: Oxford University Press Inc, 1999.

HANADA, A. In vitro fertilization in goat. **Japanese Journal of Animal Reproduction**, v.31, p.21-27, 1985.

HARPER, K. M.; BRACKETT, B. G.; Bovine blastocyst development after in vitro maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentration of ganodotrophins. **Biology of Reproduction**, v.48, p.409-416, 1993.

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**, v. 60-61, p.81-91, 2000.

HIDALGO, C.O.; DÍEZ C.; DUQUE, P. FACAL, N.; GOMEZ, E. Pregnancies and Improved Early Embryonic Development With Bovine Oocytes Matured in vitro with 9-cis-retinoic acid. **Reproduction**, v. 125, p. 409-416, 2003.

HOLM, P.; IRVINE, B.; ARMSTRONG, D. T.; SEAMARK R. F. In vitro production of sheep blastocysts from IVM-oocytes using frozen semen and oviduct epithelial cell co-culture for IVF. **Theriogenology**, v. 35, p. 214, 1991.

HOLM, P.; WALKER, S. K.; PETERSEN, B. A.; ASHMAN, R. J.; SEAMARK, R.F. In vitro vs in vivo culture of ovine IVM/IVF ova: effect on lambing. **Theriogenology**. v.41, p.217, 1994.

HOLM, P.; WALKER, S.K.; SEAMARK, R.F. Embryo viability, duration of gestation and birth weight in sheep after transfer of in vitro matured and in vivo fertilized

cultured in vitro or in vivo. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.107, p.175- 181, 1996.

HOSHI, H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, v.59, p.675-685, 2003.

IMOEDEMHE, D.A.G. – SIGUE, A.B. – PACPACO, A. The effect of caffeine on the ability of spermatozoa to fertilize mature human oocytes. **Journal Assisted of Reproduction and Genetic**, 1992, v. 9, n. 2, p. 155-160, 1992.

IZQUIERDO, D.; VILLAMEDIANA, P.; LOPEZ-BEJAR, M.; PARAMIO, M. T. Effect of in vitro and in vivo culture on embryo development from prepubertal goat IVM/IVP oocytes. **Theriogenology**. v. 57, p. 1431-1441, 2002.

KAFILZADEH, F.; KARAMI SHABANKAREH, H.; SOLTANI, L. Effect of various concentrations of Minimal Essential Medium vitamins (MEM vitamins) on development of sheep oocytes during in vitro maturation. **Iran Journal Reproduction Medicine**. v. 10, p. 93-98, 2012.

KARAMI SHABANKAREH, H.; SARSAIFI, K.; MEHRANNIA, T. In vitro maturation of ovine oocytes using different maturation media: effect of human menopausal serum. **Journal Assisted of Reproduction and Genetic**, v. 28, p.531-537, 2011.

KHARCHE, D. S.; TARU SHARMA, G.; MAJUMDAR, C. A. In vitro maturation and fertilization of goat oocytes vitrified at the germinal vesicle stage. **Small Ruminant Research**, v. 57, p. 81-84, 2005.

KIM J. Y., LEE E. J., PARK H.D., Effect of MEM Vitamins Supplementation Of *In Vitro* Maturation Medium And *In Vitro* Culture Medium On Development Of Porcine Embryos. **Asian-Australian Journal Animal Science**, v. 24, p. 1541-1546, 2011.

KOEMAN, J.; KEEFER, C. L.; BALDASSARRE, H.; DOWNEY, B. R. Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery. **Theriogenology**, v.60, p.879-889, 2003.

KRISHER, R. L.; LANE, M.; BAVISTER, B. D. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured either in semi-defined and defined culture media. **Biology of Reproduction**, v.60, p.1345-1352, 1999.

KÜHHOLZER, B.; MÜLLER, S.; TREUER, A.; SEREGI, J.; BESENFELDER, U.; BREM, G. Repeated endoscopic ovum pick-up in hormonally untreated ewes: a new technique. **Theriogenology**, v.48, p.545-550, 1997.

LEE, E. S.; FUKUI, Y. Synergistic effect of alanine on bovine embryos cultured in a chemically defined medium and amino acid uptake by in vitro-produced bovine morulae and blastocysts. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1383-1389, 1996.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. **Journal of Animal Science**, v.48, p. 76-86, 1979.

LEONI, G. G.; ROSATI, I.; SUCCU, S. A low oxygen atmosphere during IVF accelerates the kinetic of formation of in vitro produced ovine blastocysts. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.299-304, 2007.

LIVIGSTON, T.; EBERHARDT, D.; EDWARDS, J. L.; GODKIN, J. Retinol Improves Bovine Embryonic Development in vitro. **Reproductive Biology endocrinology**, v. 2, p. 83, 2004.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; MOREIRO, M. P.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, P. M. Temporal Divergence in the Pattern of Messenger RNA Expression in Bovine Embryos Cultured from the Zygote to Blastocyst Stage In Vitro or In Vivo. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1424- 1431, 2003.

MAALOUF, W.E; Lee, J.-H, CAMPBELL, K.H.S. Effects of caffeine, cumulus cell removal and aging on polyspermy and embryo development on *in vitro* matured and fertilized ovine oocytes. **Theriogenology**, v.71, p. 1083–1092, 2009.

MARTÍNEZ, E.; VÁSQUEZ, J. M.; MATAS, C.; ROCA, J.; COY, P., GADEA, J. Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. **Theriogenology**, Stoneham, v. 40, p. 547-557, 1993.

- MARTINS JÚNIOR, A.; BRACKETT, B. G. Bovine blastocyst development in chemically defined media after in vitro maturation with low concentration of recombinant human FSH. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p.398-400, 2003.
- MAX, C. M.; SANTOS, G. M. G.; MELO-STERZA, A. F.; SILVA-SANTOS, C. K.; MOROTTI, F.; BASSO, C. A.; PONTES, F. H. J.; BALDASSARRE, H.; SENEDA, M. M. In vitro embryo production in sheep: Pregnancy after long periods of oocyte and embryo transport. **Small Ruminant Research**, v.105, p. 286– 289, 2012.
- MÁXIMO, D. M. **Características ultraestruturais de ovócitos ovinos durante a maturação *in vitro***. 2009. 51 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009.
- MEHLMANN, L. M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction**, v. 130, p. 791-799, 2005.
- MICLEA, I.; NICOLAE, P.; HETTIG, A.; ZĂHAN, M.; MICLEA, V. **Alpha-tocopherol and Ascorbic Acid Combinations Influence the Maturation of Sheep Oocytes**. *Animal Sciences and Biotechnologies*, v. 43, 2010.
- MINGOTI, G. Z. **Aspectos técnicos da produção in vitro de embriões bovinos**. In: Tópicos Avançados em Biotecnologia da Reprodução, 2005, Jaboticabal, SP. Jaboticabal, SP: Funep, 2005.
- MORISAWA, M. et al. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes, **Journal of Experimental Biology**, London, v. 107, p. 95-103, 1983.
- MOOR, R.M; TROUNSON, A. O. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. **Journal Reproduction Fertility**, v.49, p.101-109, 1977.
- MORTON, K. M.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS G. Effect of aspiration pressure during oocyte harvesting on oocyte recovery and in vitro development of ovine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 106-110, 2007.

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

NATARAJAN, R.; SHANKAR, M.B.; MUNUSWAMY, D. Effect of alphatocopherol supplementation on in vitro maturation of sheep oocytes and in vitro development of preimplantation sheep embryos to the blastocyst stage. **Journal Assisted of Reproduction and Genetic**, v.27, p.483-490, 2010.

NIWA, K.; OGHODA, O. Synergistic effects of caffeine and heparin on in vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. **Theriogenology**. v.30, p. 733-741, 1988.

NOSE, K. Role of reactive oxygen species in the regulation of physiological functions. **Biology and Pharmacology Bulletin**, v.23, n.8, p.897-903, 2000.

OSÉS, M. V.; TERUAL, M. T.; CABODEVILA, J. A. Utilización de sêmen bovino sexado em inseminación artificial, transferencia embrionária y fertilización in vitro. **Tese** (Monografia de conclusão de curso). Arquivo da Facultad de Ciencias Veterinarias (UNCPBA). Argentina, 2009.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; WINER, M.A.; FIRST, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, v.38, n.1, p.1171-1180, 1988.

PAULA, N. R.O.; CARDOSO, J. F. S.; OLIVEIRA, M. A. L.; FREITAS, V. J. F. Embriões caprinos produzidos in vitro ou in vivo: técnicas, problemas e perspectivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v. 32, p. 21-35, 2008.

PAULA, N.R.O.; MAGALHÃES, D.M.; ARRUDA, I.J.; ANDRADE, M.L.L.; SOUZA, A.L.; PEREIRA, A.F.; ALMEIDA, K.C.; AVELAR, S.R.G.; RONDINA, D.; FREITAS, V.J.F. Efeito da pressão de aspiração folicular sobre a taxa de recuperação e a qualidade do complexo cumulus-oócito de cabras e ovelhas exploradas no Nordeste do Brasil. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 19, Angra dos Reis. **Anais...** São Paulo. v. 36, p. 366, 2005.

PAVLOK, A. Penetration of hamster and pig zona-free eggs by boar ejaculated spermatozoa preincubated in vitro. **International Journal Fertility**, v. 26, p. 101-106, 1981.

PEREIRA-BONNET, F.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, R.; OLIVERA, R. et al. A unique method to produce transgenic embryos in ovine, porcine, feline, bovine and equine species. **Reproduction, Fertility and Development**, v.20, p.741-749, 2008.

PIETERSE, M. C.; KAPPEN, K. A. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**. v. 30, p. 751- 762, 1992.

PIVKO, J.; GRAFENAU, P.; KOPENCY. Nuclear fine structure and transcription in early goat embryos. **Theriogenology**. v. 21, p. 126-137, 1995.

POZZOBON, S.E. Ácido ascórbico na produção in vitro de embriões bovinos. **Tese** (Doutorado) Santa Maria, RS, Brasil 2008.

PRESTES, N. C.; ALAVARENGA, F. C. L. **Obstetrícia Veterinária**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ. p. 241, 2006.

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

PTAK, G.; FEDERICA LOPES, F.; KAZUTSUGU MATSUKAW, K. Leukaemia inhibitory factor enhances sheep fertilization in vitro via an influence on the oocyte. **Theriogenology**, v.65, p.1891-1899, 2006.

RAUBER, L. P.; ALVES, D. F.; FIGUEIRÓ, G. M.; BRUM, D. S.; HILGERT, T. F.; BERNARDI, M. L.; SILVA, C. A. M.; RUBIN, M. I. B. Desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos mantidos em fluido folicular bovino de folículos de diferentes diâmetros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.40, p.169 – 177. 2003.

RENESTO, A.; COELHO, L. A. Associação das biotécnicas: Aspiração folicular guiada por ultrassonografia e superovulação na produção in vitro e in vivo de embriões bovinos. **Tese** (Mestrado). Arquivos da Faculdade de Ciências Agrárias UNESP. P. 17-31, 2004.

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAM, A.; PREZ-GARNOLO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence

of serum: Implication for blastocyst development, Cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biology of Reproduction**, v.68, p.236-43, 2003.

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

ROBERTSON, I.; NELSON, R. **Certification and identification of embryos**. In: D.A. Stringfellow; M.D. Givens (eds.), Proceedings of Guide of International Embryo Transfer Society, p.86-105, 2010.

RODRÍGUEZ, C.; ANEL, L.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J. C.; CHAMORRO, C. A.; PAZ, P. Ovum pick-up in sheep: a comparison between different aspiration devices for optimal oocyte retrieval. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, p.106-113, 2006.

SAACKE, R. G.; MARSCHALL, C. E. Observations on the acrosomal cap of fixed and unfixed bovine spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge, v. 16, p. 511-514, 1968.

SAKAGUCHI, M.; DOMINKO, T.; LEIBFRIED RUTLEDGE, M. L.; NAGAI, T.; FIRST, N. L. A combination of EGF and IGF-1 accelerates the progression of meiosis in bovine follicular oocytes in vitro and fetal calf serum neutralizes the acceleration effect. **Theriogenology**.v.54, p.1327-1342, 2000.

SAKAMOTO N., OZAWA M., MORIMOTO A., DL- $\alpha$ -Tocopherol Acetate Mitigates Maternal Hyperthermia-Induced Pre-Implantation Embryonic Death Accompanied By a Reduction Of Physiological Oxidative Stress In Mice. **Reproduction Research**, v. 135, p. 489–496, 2008.

SALES, J. N. de S. Reposta Superovulatória e Qualidade de Embriões Novilhas e Vacas Holandesas Suplementadas com Duas Doses de  $\beta$ -Caroteno Associado ao Tocoferol. **Dissertação** (Mestrado) – UFL, Lavras, 2005.

SANGILD, P. T., SCHMIDT, M., JACOBSEN, H. Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from in vitro produced bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v.62, p.1495-1504, 2000.

SENEDA, M. M. **Aspiração bem feita. Cultivar Bovinos**. n. 17, abr, 2005. Disponível em <http://www.grupocultivar.com.br>. Acesso em 20 nov. 2012.

SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; de OLIVEIRA, J. A.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 37-43, 2001.

SIDHU, K. S.; GURAYA, S. S. Current Concepts in Gamete Receptors for Fertilization in Mammals. **International Review of Cytology**, v. 127, p. 253-263, 1989.

SILVA, G.M.; ARAÚJO, V.R.; DUARTE A.B.G. Papel dos antioxidantes no cultivo in vitro de células ovarianas. *Revista Brasileira Reprodução Animal.*, v.35, p.315-326, 2011.

SINGH, J. P.; BABCOCK, D. F.; LARDY, H. A. Increased calcium-ion influx is a component of apacitation of spermatozoa. **Biochemistry Journal**, v.172, p.549-556, 1978.

SOCACIU, C., Antioxidant phytochemicals: chemical characterization, functions and actions, **UASMV-CN Bulletin, Agriculture ISSN**, v.1454-2382, ,p. 57, 22-29, 2002.

ŠPALEKOVÁ, E.; MAKAREVICH, A. V.; PIVKO, J. Effect of caffeine on parameters of ram sperm motility. **Slovak Journal of Animal Science**, v.44, p. 78-83, 2011.

STEELE ,C.E.; JEFFERY, E.H.; DIPLOCK, A.T. The effect of vitamin E and synthetic antioxidants on the growth in vitro of explanted rat embryos. **The Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, n.1, p.115-123, 1974.

SZOLLOSI, D. **Oocyte maturation**. In: *Reproduction in mammals and man*. (Eds C. Thibault, C. Levasseur and R.H.F. Hunter), p. 307-325, 1993.

TABET, A. F. Transferência intratubária videolaparoscópica de embriões ovinos fertilizados *in vitro*. **Tese** (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2007.

TANNO, P. H. Estudo das alterações morfo funcionais de espermatozoides bovinos submetidos à sexagem por meio da técnica de citometria de fluxo. **Dissertação** (Mestrado). Arquivo da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2009.

TAO ,Y.; ZHOU, B.; XIA, G.; WANG, F.; WU, Z.; FU, M. Exposure to L-ascorbic acid or alpha-tocopherol facilitates the development of porcine denuded oocytes from metaphase I to metaphase II and prevents cumulus cells from fragmentation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.39, p. 52-57, 2004.

THOMPSON, J. G. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.263-275, 2000.

TRABER, M. G.; SERBINOVAT, E. A.; PACKERT, L. Biological activities of tocotrienols and tocopherols. **Antioxidant Food Supplements In Human Health**. 1999.

VALDEBENITO, N. I. Efecto de La cafeína em La motilidade y fertilidade espermática de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). **Información Tecnológica**, La Serena, v. 18, n. 2, p. 61-65, 2007.

VALLET, J. C. et al. Feasibility and repeatability of embryo recoveries from dairy goats under laparoscopy. In: SCIENTIFIC MEETING OF EUROPEAN EMBRYO TRANSFER ASSOCIATION, 3., 1987, Lyon. **Proceedings**...Lyon: AETE, p.60, 1987.

VAN DE LEEMPUT, E.E.; VOS, P.L.A.M.; ZEINSTRA, E.C. et al. 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.

- VARAGO F.C; MENDONÇA, L.F; LAGARES, M.A, Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, p. 100-109, 2008.
- VISCONTINI, P. E.; GALANTINO-HOMER, H.; MOORE, G. D.; BAILEY, J. L.; NING, X.; FORNES, M.; KOPF, G. S. The molecular basis of sperm capacitation. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 19, p.242-248, 1998.
- WANG, G. Z.; XU, R. Z.; YU, D. S. Effects of oocyte collection techniques and maturation media on in vitro maturation and subsequent embryo development in Boer goat. **Czech Journal Animal Science**, v.52, p. 21–25, 2007.
- WANI, N. A. In vitro maturation an in vitro fertilization of sheep oocytes. **Small Ruminant Research**, v.44, p.89-95, 2002.
- WANI, N. A.; WANI, G. M.; KHAN, M. Z.; SALAHUDIN, S. Effect of oocyte harvesting techniques on in vitro maturation and in vitro fertilization in sheep. **Small Ruminant Research**, v.36, p.63-67, 2000.
- WANI, N. A.; WANI, G. M.; KHAN, M. Z.; SIDIQI, M. A. Effect of different factors on the recovery rate of oocytes for in vitro maturation and in vitro fertilization procedutes in sheep. **Small Ruminant Research**, v.34, p.71-76, 1999.
- WANI, R. A.; KHAN, Z. M.; SOFI, A. K.; LONE, A. F.; MALIK, A. A.; BHAT, A. F. Effect of cysteamine and epidermal growth factor (EGF) supplementation in maturation medium on in vitro maturation, fertilization and culturing of embryos in sheep. **Small Ruminant Research**. v.106, p.160-164, 2012.
- WARD, F.; ENRIGHT, B.; RIZOS, D.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. **Theriogenology**, v.57, p.2105-2117, 2002.
- WATSON, A. J.; DE SOUSA, P.; CAVENEY, BARCROFT, L. C.; NATALE, D.; URQUHART, J.; WESTHUSIN, M. E. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. **Biology of Reproduction**, v.62, p.355-364, 2000.

WHITE, D. R.; AITKEN, R. J. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. **Gamete Research**, v.22, p.163-77, 1989.

WINDSOR, D. P. Mitochondrial function and ram sperm fertility. **Reproduction Fertility and Development.**, v. 55, p. 279-284, 1997.

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

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill J (Ed.) The physiology of reproduction. 2.ed. **New York: Raven**, p.189-317, 1994.