

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO - UFMA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS - CCAA
CURSO: ZOOTECNIA
MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO

**CLASSIFICAÇÃO DE OÓCITOS IMATUROS BOVINOS DERIVADOS DE
FÊMEAS *POST-MORTEM* PELO MÉTODO AZUL CRESIL BRILHANTE
(ACB)**

Aluno: Cristian Jordan Bezerra Matos

Orientador: Prof. Dr. José Ribamar de Souza Torres Júnior

CHAPADINHA- MA

DEZEMBRO, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO - UFMA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS - CCAA
CURSO: ZOOTECNIA
MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO

**CLASSIFICAÇÃO DE OÓCITOS IMATUROS BOVINOS DERIVADOS DE
FÊMEAS *POST-MORTEM* PELO MÉTODO AZUL CRESIL BRILHANTE
(ACB)**

Trabalho apresentado ao Curso de Zootecnia da Universidade Federal do Maranhão para a obtenção do título de Bacharel em Zootecnia.

Aluno: Cristian Jordan Bezerra Matos

Orientador: Prof. Dr. José Ribamar de Souza Torres Júnior

Co-Orietadora: M.Sc. Itamara Gomes França

CHAPADINHA- MA

DEZEMBRO, 2018

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

BEZERRA MATOS, CRISTIAN JORDAN.

CLASSIFICAÇÃO DE OÓCITOS IMATUROS BOVINOS DERIVADOS DE FÊMEAS POST-MORTEM PELO MÉTODO AZUL CRESIL BRILHANTE ACB / CRISTIAN JORDAN BEZERRA MATOS. - 2018.

42 p.

Coorientador(a): ITAMARA GOMES FRANÇA.

Orientador(a): JOSÉ DE RIBAMAR DE SOUSA TORRES JUNIOR.

Monografia (Graduação) - Curso de Zootecnia,
Universidade Federal do Maranhão, UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO- CHAPADINHA-MA, 2018.

1. Bovino de corte. 2. Competência oócitaria. 3. Fertilização in vitro. I. GOMES FRANÇA, ITAMARA. II. TORRES JUNIOR, JOSÉ DE RIBAMAR DE SOUSA. III. Título.

CRISTIAN JORDAN BEZERRA MATOS

**CLASSIFICAÇÃO DE OÓCITOS IMATUROS BOVINOS DERIVADOS DE
FÊMEAS *POST-MORTEM* PELO MÉTODO AZUL CRESIL BRILHANTE
(ACB)**

Trabalho apresentado ao Curso
de Zootecnia da Universidade
Federal do Maranhão para a
obtenção do título de Bacharel
em Zootecnia.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alécio Matos Pereira
Curso de Zootecnia – CCAA/UFMA

Prof. Dr. Marcos Antonio Delmondes Bomfim
Curso de Zootecnia – CCAA/UFMA

Prof. Dr. José Ribamar de Souza Torres Júnior
Curso de Zootecnia – CCAA/UFMA
Orientador

CHAPADINHA-MA

DEZEMBRO, 2018

**Ao Deus Trino todo poderoso e à minha família,
em especial, minha mãe.**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre guiar meus passos nesta caminhada e ter-me concedido auxílio em momentos difíceis. A Ele toda honra e toda glória.!

À Universidade Federal do Maranhão em especial ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade concedida.

*Ao Professor **José de Ribamar de Sousa Torres Junior** pela orientação, confiança e contribuição fundamental no processo de aprendizagem.*

*Aos integrantes do grupo de pesquisa LAPIVE (**Lucas, Joaquim de Sousa, Bento Douglas, Joaquim Cunha, Hellyda, Larissa**) que me ajudaram na realização de etapas primordiais deste trabalho e em especial a minha “Tutora” **Itamara Gomes França** pelos ensinamentos pela contribuição total no desenvolvimento deste trabalho que em momentos de extrema importância esteve sempre comigo;*

Aos Funcionários do abatedouro municipal pela contribuição e paciência, pois sem eles a realização deste trabalho seria ineficaz;

*Aos meus amigos que conquistei durante essa jornada difícil, **Verde,Nathan, Zé Neto,Joaquim,Aylpy.....***

*Aos meus pais, **Joelson da Silva Matos e Jaqueline da Silva Bezerra**, minhas irmãs **Juliana Matos e Joyce Matos**, minha madrinha **Carmelina da Silva Bezerra**, minha namorada **Silvia Fragoso**, meus saudosos avós, por sempre estarem comigo e apoiarem minhas ideias. Sem vocês eu não teria conseguido!!*

Os mais sinceros agradecimentos!

“Ha duas maneiras de viver uma vida: a primeira é pensar que nada é um milagre e a segunda é pensar que tudo é um milagre. Do que estou seguro é que Deus existe.”

Albert Einstein

RESUMO

CLASSIFICAÇÃO DE OÓCITOS IMATUROS BOVINOS DERIVADOS DE FÊMEAS *POST-MORTEM* PELO MÉTODO AZUL CRESIL BRILHANTE (ACB)

A competência da produção *in vitro* de embriões (PIV), tem sido delimitada pelas condições de cultivo *in vitro* e baixa eficiência da qualidade dos oócitos selecionados para etapa de maturação *in vitro*. A utilização do corante Azul Cresil Brilhante (ACB) junto à seleção morfológica convencional tem sido uma escolha de métodos não invasivos que buscam selecionar oócitos de maior competência. Objetivou-se com o presente estudo selecionar oócitos imaturos bovinos para a maturação *in vitro* (MIV) pelo método Azul Cresil Brilhante (ACB) em condições de umidade e atmosfera ambiente. O estudo foi conduzido no Laboratório de produção *in vitro* de embriões da Universidade Federal do Maranhão - Campus Chapadinha. Os ovários foram obtidos em abatedouro, foram puncionados folículos com diâmetro variando de 3 a 12 mm, em seguida os oócitos foram rastreados e classificados sob estereomicroscópio por critérios morfológicos em quatro graus: Grau I (três ou mais camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo), Grau II (uma ou duas camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo), Grau III (camada incompleta de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo ou heterogêneo) e Grau IV (células do *cumulus* com aspecto gelatinoso ou oócito degenerado com grânulos escuros). Em seguida, os oócitos selecionados foram incubados em gotas de ACB diluído em PBS sobre placa aquecedora à 38°C por 60 min. Dentro do grupo de oócitos GI, o percentual de oócitos ACB+ foi significativamente maior que o percentual de ACB-. Nos oócitos classificados morfológicamente como GII foi encontrado um maior percentual de oócitos ACB-. O percentual de ACB+ e ACB- foram similares dentro do grupo de CCOs GIII, e taxa de ACB- significativamente maior grupo GIV. Ao comparar o percentual de corados e não corados entre os graus de classificação oocitária, verificou-se a taxa de ACB+ foi significativamente maior nos graus I e III. E consequentemente os graus II e IV apresentaram maiores taxas de CCOs ACB-. Concluiu-se que o método de classificação oocitária ACB, selecionou oócitos mais competentes (ACB+) classificados em Grau 1, embora não tenha sido capaz de selecionar oócitos viáveis classificados em Grau 2. Deste modo o método de coloração ACB foi atenuado por situações adversas de temperatura e umidade.

Palavras-Chave: bovino de corte, competência oocitária, fertilização *in vitro*.

ABSTRACT

CLASSIFICATION OF IMMATURE BOVINE OOCYTES DERIVED FROM POST-MORTEM FEMALES BY BLUE SHINING CRESIL METHOD (BSCM).

The competence of in vitro embryo production (IVP) has been delimited by in vitro culture conditions and low efficiency of oocyte quality selected for in vitro maturation stage. The use of Blue Shining Cresil (BSC) with conventional morphological selection has been a choice of noninvasive methods that seek to select more competent oocytes. The objective of this study was to select bovine immature oocytes for in vitro maturation (IVM) using the Blue Shining Cresil Method (BSCM) under conditions of humidity and ambient atmosphere. The study was conducted at the in vitro embryo production laboratory of the Federal University of Maranhão - Chapadinha Campus. Ovaries were obtained at slaughterhouse, follicles with a diameter ranging from 3 to 12 mm were punctured, and the oocytes were then screened and stereomicroscopically classified by four-degree morphological criteria: Grade I (three or more layers of cumulus cells and homogeneous cytoplasm), Grade II (one or two layers of cumulus cells and homogeneous cytoplasm), Grade III (incomplete layer of cumulus cells and homogeneous or heterogeneous cytoplasm), and Grade IV (cumulus cells with a gelatinous appearance or degenerated oocyte with dark granules). Then, the selected oocytes were incubated in drops of ACB diluted in PBS on hot plate at 38 ° C for 60 min. Within the group of GI oocytes, the percentage of ACB + oocytes were significantly higher than the percentage of ACB-. In oocytes classified morphologically as GII were found a higher percentage of oocytes ACB-. The percentages of ACB + and ACB were similar within the group of CIIs GIII, and rate of CBA- significantly higher GIV group. When comparing the percentage of stained and non-stained between degrees of oocyte classification, it was found that the rate of CBA + was significantly higher in grades I and III. Therefore, grades II and IV showed higher rates of ACB-CCO. It was concluded that the ACB oocyte classification method selected more competent oocytes (Grade BCA) classified in Grade 1, although it was not able to select viable oocytes classified in Grade 2. In this way the CBA coloration method was attenuated by adverse temperature and humidity.

Keywords: Beef cattle, Oocyte competence, *in vitro* fertilization.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 Oogênese e Foliculogênese.....	15
2.2. CCOS (complexo <i>cumulus</i> oócitos)	16
2.3. Seleção de CCOs para produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE)	18
2.4. Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH).....	19
2.5. Seleção de oócitos pelo método Azul Cresil Brilhante (ACB)	21
3. OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo geral	24
3.2 Objetivos específicos	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1. Coletas de Ovários.....	25
4.2. Punção folicular e classificação morfológica dos CCOs	25
4.3. Classificação de oócitos pelo método ACB	27
4.4 Análise estatística.....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÃO.....	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

LISTAS DE FIGURAS

CLASSIFICAÇÃO DE OÓCITOS IMATUROS BOVINOS DERIVADOS DE FÊMEAS POST-MORTEM PELO MÉTODO AZUL CRESIL BRILHANTE (ACB)

- Figura 1: Demonstração dos oócitos corados (ACB+) e não corados (ACB-) após serem expostos a 60 min ao corante Azul Cresil Brilhante (ACB). 21
- Figura 2: Imagens ilustrativas dos preparativos para aspiração folicular (1), ovários selecionados para aspiração (2), aspiração folicular (3), líquido folicular aspirado, seleção dos oócitos (4) e corante ACB diluído em PBS (5). 26
- Figura 3: Classificação de acordo a camada do *cumulus*, Graus I, II, III e IV. 27
- Figura 4: Imagens de oócitos submetidos à coloração com ACB. Oócitos corados (ACB+) e não corados (ACB-) (A e B). 28

LISTA DE SIGLAS

6-GP	Glicose-6fosfato
6-PG	Glicose-6fosfogliconato
ACB	Azul Cresil Brilhante
ATP	Adenosina Trifosfato
CCOs	Complexo <i>cúmulus</i> oócitos
CGs	Células germinativas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FSH	Hormônio folículo estimulante
G6PDH	Glicose 6-fosfato desidrogenase
LH	Hormônio Luteinizante
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mPBS	Solução tampão fosfato modificada
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotideo Fosfato
OPU	<i>Ovum Pick Up</i> (Punção folicular guiada por ultrassom)
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PPP	Via das Pentoses Fosfato
RNA	Ácido Ribonucleico
TNCS	Técnica de Transferência nuclear de células

1. INTRODUÇÃO

Na produção *in vitro* de embriões (PIVE), o advento da aspiração folicular guiada por ultrassom OPU (*Ovum Pick Up*) possibilitou a obtenção de complexos *cumulus* oócitos (CCOs) a partir de doadoras vivas (MAPLETOFT e HASLER, 2005; DENIS, 2008) fato este que impulsionou definitivamente a PIVE. Entretanto, situações como o transporte dos CCOs do local de coleta até o laboratório, assim como métodos adequados que avaliem a competência desses CCOs, ainda permanecem como desafios e necessitam ser profundamente compreendidos (BLONDIN, 2017).

A PIVE compreende várias etapas e cada uma tem influência direta no resultado final. De forma sucinta são as seguintes as etapas do processo: recuperação, seleção e maturação *in vitro* de CCOs, capacitação espermática seguida de fecundação *in vitro*, desenvolvimento *in vitro* dos presumíveis zigotos e transferência de embriões para receptoras sincronizadas (VARAGO et al., 2008).

Em virtude de todas as suas aplicações, vários grupos têm buscado aumentar a eficiência da PIVE, visando conhecer os fatores envolvidos em cada etapa.

A variável que mais interfere na maturação durante a PIVE é justamente a qualidade dos oócitos selecionados (ADAMS et al., 1999).

A seleção de oócitos realizada atualmente baseia-se em critérios morfológicos, mas apesar de mostrar resultados satisfatórios, pode não demonstrar a real qualidade do oócito quanto à competência nuclear, citoplasmática e molecular (DODE, 2006). Isso demanda busca constante por métodos não invasivos de seleção de oócitos de maior competência, visando à produção de embriões de melhor qualidade e maior potencial de desenvolvimento, uma vez que as condições *in vitro* ainda estão muito aquém daquelas *in vivo*.

Para a classificação dos oócitos, utilizam-se alguns métodos no intuito de selecionar os melhores para aplicação das biotécnicas de produção *in vitro*

de embriões, mas certos pré-requisitos no método de seleção deveriam ser atendidos, como: ser método simples e rápido, de baixo custo e de alta confiabilidade e, acima de tudo, apresentar segurança em sua utilização, ou seja, não acarretar prejuízos aos oócitos (GOOVAERTS et al., 2010; BOLS et al., 2012). Porém, considera-se que, até o momento, nenhuma técnica de seleção reúna todos esses fatores (TORNER et al., 2008; GOOVAERTS et al., 2010).

Combinada a seleção morfológica, a coloração pelo corante vital Azul Cresil Brilhante (ACB) tem sido utilizada como um método não invasivo para seleção de oócitos imaturos em diversas espécies (ALM et al., 2005; PUJOL et al., 2004; WONGSRIKEAO et al., 2006, WU et al., 2007), com resultados positivos em relação ao método de seleção morfológica quando utilizado unicamente. Este corante é capaz de detectar a atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), presente em maior concentração em oócitos em crescimento (ALM et al., 2005).

Com base nestas informações, o corante ACB poderia ser utilizado como uma ferramenta útil na busca por maior compreensão dos processos que ocorrem no interior das células e tornaria possível distinguir com maior precisão aqueles oócitos mais competentes para os sistemas de produção *in vitro* de embriões.

Dessa forma, o presente trabalho reuniu informações com referência a coloração de oócitos imaturos por meio do teste de ACB, a fim de se investigar a real eficiência do referido método.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Oogênese e Foliculogênese

A unidade básica estrutural e funcional do ovário de um mamífero é o folículo ovariano, pois, habilita dentro da sua estrutura o habitat fundamental para o crescimento e a maturação oocitária (GOSDEN et al., 1993).

A oogênese pode ser considerada como a formação do gameta feminino (VAN DER HURK e ZAO, 2005). A formação dos gametas femininos em bovinos ocorre durante o período embrionário, próximo aos 40 dias de gestação (RUSSE, 1983). No embrião, as células germinativas primordiais, localizadas na parede do saco vitelínico, migram para as gônadas em desenvolvimento, perdem suas características de motilidade e sofrem extensiva proliferação celular e redistribuição das organelas citoplasmáticas transformando-se em oogônias (SADEU et al., 2006).

Conforme Van de Hurk e Zhao (2005), o oócito primário passa pelas fases de leptóteno, zigóteno e paquíteno e para em diplóteno da prófase I da meiose I, na qual permanece retido durante todo o período de desenvolvimento folicular.

A foliculogênese bovina é um processo contínuo de crescimento e atresia dos folículos ovarianos que se inicia na vida fetal, passa pela puberdade e continua na vida reprodutiva até a senilidade (NILSSON et al., 2001). Em ruminantes e primatas, ainda durante a vida fetal, logo após a formação do oócito, ocorre à formação do folículo. Cada folículo tem seu próprio ambiente endócrino individual dentro do ovário, levando a progressão do desenvolvimento folicular e seu crescimento de modo assincrônico (FORTUNE et al., 2000).

O estudo da foliculogênese e os fatores de crescimento folicular são necessários para aperfeiçoar a sincronização de estro, transferência de embriões e PIVE, sendo assim importante para se desenvolver alternativas

de aumento da eficácia das biotecnologias (FAIR, 2003; BASSO et al., 2002). Em algumas pesquisas, as gonadotrofinas e esteroides presentes no desenvolvimento folicular e nos CCOs, mostram tais influência sobre os fatores de crescimento (MIHM et al., 2003).

A foliculogênese têm chamado atenção a respeito da biologia celular na fase de desenvolvimento do folículo e também no estabelecimento de técnicas eficientes de isolamento e cultivo *in vitro* que suportem o crescimento folicular até o estágio de maturação (PICTON, 2001).

À medida que o folículo cresce e o antro é formado, as células da granulosa se separam em dois subtipos: células do *cumulus*, íntima e metabolicamente ligadas ao oócito, e células murais, que formam a parede do folículo (GILCHRIST et al., 2004).

As camadas celulares e a parede do folículo vão se diferenciando, onde o tamanho do folículo pré-ovulatório apresenta diâmetro diferente entre espécies; bovinos, suínos, equinos e ovinos este diâmetro pode variar entre 15-20 mm, 6-7 mm, 35-50 mm e 8-10 mm, respectivamente (VAN DER HURK e ZAO, 2005).

O hormônio folículo estimulante (FSH) estimula um grupo de folículos a iniciar o desenvolvimento e a maturação, sendo esse processo chamado de recrutamento, posteriormente, os folículos passam por processos distintos, como seleção folicular e dominância folicular respectivamente, onde a seleção é processo pelo qual somente um folículo é escolhido, assim evitando a atresia até alcançar a ovulação e a dominância é o meio pelo qual um folículo selecionado exerce dominância, fazendo com que o desenvolvimento final dos demais e o recrutamento de um novo grupo de folículos não sejam completados (DE BEM et al., 1997). Em seguida, apresenta-se uma nova fase de desvio, onde o folículo de dominância cresce mais, fazendo com que os folículos subordinados não se formem do ponto de vista funcional e torna-se dependente do hormônio luteinizante (LH) até o processo final de ovulação (GUINTER et al., 2001; WU et al., 2000).

2.2. CCOS (complexo *cumulus* oócitos)

Pode-se caracterizar o complexo *cumulus* oócito (CCO) como a unidade funcional dos ovários. Numerosos substratos energéticos (glicose, piruvato, lactato, aminoácidos) são disponibilizados para os CCOs quando no interior do fluido folicular (SUTTON et al., 2003). O gameta feminino e as células somáticas ao seu redor estão em intensa interação e desta ordem torna-se inadequado o estudo metabólico em separado desses dois tipos celulares (SUTTON et al., 2003).

Os CCOs são classificados de acordo com a quantidade de camadas na zona pelúcida em Grau 1 (zona compacta, sem alterações microscópicas visíveis e com mais de três camadas de células do *cumulus* envolvendo totalmente a zona pelúcida); Grau 2 (constituído de até três camadas de células do *cumulus* envolvendo totalmente a zona pelúcida); Grau 3 (oócitos possuindo áreas da zona pelúcida totalmente desprovida de células); e Grau 4 (oócitos desnudos, parcialmente desnudos e expandidos, ou seja, desprovidos de células do *cumulus*) (GUERRA, 1998).

A qualidade do oócito é determinante para a sua capacidade de se desenvolver para a fase de blastocisto (BEVERS et al., 2000).

Uma série de modificações de sua estrutura e na própria molécula, ocorrem durante seu desenvolvimento, onde possuem ligação direta com o metabolismo de açúcares pela glicose (VASSENA et al., 2003).

Durante o processo de maturação do oócito, as células presentes na zona pelúcida possuem algumas funções específicas tais como: redução da esteroidogênese e aumento na produção de ácido hialurônico para a expansão do cumulus (EPPIG et al., 2001). Alguns eventos moleculares ocorrem no citoplasma durante a maturação do oócito e se desenvolve aos poucos, sendo sincronizado com os eventos foliculares (BEVERS et al., 2000).

Os CCOs fazem a regulação da maturação do oócito que é de suma importância e a anulação das células do complexo significa o retardamento no desenvolvimento embrionário (ZHANG et al., 1995; SHIOYA et al., 1998). No entanto, a quantidade de embriões que se desenvolve a partir do processo de maturação e fecundação *in vitro* é menor daquele obtido *in vivo*, isso porque apresentam problemas no processo de maturação citoplasmática, também conhecido capacitação oocitária (BERTAGNOLLI et al., 1997).

A maioria das pesquisas relacionadas com reprodução bovina obtêm oócitos obtidos de ovários de animais provenientes de abatedouros, com a presença da camada de células do *cumulus* firme e compacta (COSTA, 1994; MALARD, 2000).

2.3. Seleção de CCOs para produção *in vitro* de embriões (PIVE)

Com relação ao desenvolvimento pré-implantação, inúmeras evidências demonstram que o potencial de desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* depende da qualidade dos oócitos dos quais se originam, influenciando a qualidade embrionária (NEMCOVA et al., 2006; VANDAELE et al., 2007), o estabelecimento da prenhez e o desenvolvimento fetal.

O critério rotineiramente utilizado pela quase totalidade dos laboratórios, para seleção de oócitos, está relacionado à morfologia do complexo *cumulus*-oócito e aspecto do citoplasma, classificados em quatro categorias (Grau I a IV). Apesar da qualidade do oócito estar diretamente relacionada ao número de células do *cumulus* e ao grau de compactação destas (MADISON et al., 1992) os baixos resultados da técnica podem ser justificados pela baixa qualidade dos oócitos que são selecionados para a MIV (maturação *in vitro*), visto que os critérios morfológicos utilizados são subjetivos e podem apresentar relativa variação quanto a real capacidade de desenvolvimento dessas células (DE LOOS et al., 1992).

Vassena et al. (2003) obtiveram melhores taxas de produção de blastocistos a partir de oócitos obtidos de folículos coletados no 5º dia do ciclo estral. Entretanto, apesar da qualidade morfológica dos oócitos ser positivamente ligada a bons resultados na PIVE, esses autores observaram que a qualidade morfológica não mudou ao longo da onda folicular e que a porcentagem de CCOs degenerados aumentou do dia 3 para os dias 5 e 7 do ciclo. Tal estudo serve como base para revisar os critérios morfológicos de seleção de oócitos nos laboratórios de PIVE.

Hawk e Wall (1994) observaram que alguns oócitos classificados no amplo grupo de qualidade “intermediária-marginal” (células da granulosa compactas eventualmente aderidas - poucas células cobrindo metade ou toda a zona pelúcida, com citoplasma demonstrando grânulos finos de tamanhos

moderados) possuem potencial de desenvolvimento normal e alguns podem ter potencial reduzido. Mas, dentro deste grupo, o subgrupo caracterizado por mínima quantidade de células do *cumulus* apresentou as menores taxas de blastocistos expandidos.

Segundo Pereira et al. (2007) oócitos classificados como grau II (uma a três camadas de células do *cumulus*) não apresentam diferença quanto às taxas de clivagem de oócitos grau I (mais de três camadas de células compactas do *cumulus*), e apesar do uso de oócitos de menor qualidade aumentar a produção total de blastocistos, esta prática diminui a porcentagem de blastocistos comparada aos obtidos de oócitos grau I.

Segundo Han et al. (2006) o potencial de desenvolvimento de oócitos proveniente de folículos de mesmo tamanho, CCOs de mesma morfologia e mesmo grau de expansão de células do *cumulus*, diferem de acordo com o nível de apoptose das CGs. Por outro lado, em mesmo percentual de apoptose dessas células, a capacidade de desenvolvimento de oócitos varia com o tamanho do folículo, morfologia dos CCOs e grau de expansão do *cumulus*. Isto sugere que o potencial de desenvolvimento oocitário é determinado pela interação de múltiplos fatores. Somado a isto, apesar da origem e qualidade do animal ser desconhecida, oócitos recuperados de ovários de matadouro são comumente utilizados em estudos dos processos de maturação, fertilização, produção e criopreservação de embriões (DIELEMAN et al., 2002).

2.4. Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH)

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) é a primeira enzima da via das pentoses fosfato (PPP) que pelo processo de oxidação da glicose-6-fosfato (G-6P) para glicose-6-fosfogliconato (6-PG) acaba gerando energia reduzida na célula através NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleotideo Fosfato) (CHEUN, 1966).

A G6PDH é sintetizada durante a oogênese quando os oócitos se encontram em fase de crescimento, demonstrando desta forma sua importância na capacidade de desenvolvimento oocitário, esta enzima também está envolvida na geração de ribose-5-fosfato e NADPH, pela via das pentoses fosfato, assumindo um importante papel numa grande variedade de processos

celulares, tais como a redução da glutathiona intracelular, e síntese de nucleotídeos (PAWLAK et al., 2011).

O oócito metaboliza glicose através da glicólise, da PPP e do ciclo de Krebs. A glicólise contribui com a produção de ATP e disponibiliza piruvato e NADPH para oxidação. Por outro lado, a PPP não gera ATP, mas sim NADPH e ribose para a síntese de RNA e DNA, importantes para a adequada maturação nuclear e citoplasmática (KRISHER et al., 2007).

Os oócitos bovinos possuem atividade relativamente elevada da G6PDH (enzima limitante da etapa oxidativa) quando associadas às células do *cumulus* (CETICA et al., 2002), sugerindo uma atividade potencial mais elevada da PPP nos CCOs em comparação com as células do *cumulus* individuais.

Segundo Wassarman et al. (1988), grande variedade de proteínas é sintetizada a partir de oócitos imaturos inclusive a G6PDH, onde ela é ativada no crescimento oocitário (MANGIA et al., 1975), mas são deficientes em ação em células que já tenham terminado sua fase de crescimento (WASSARMAN et al., 1988).

Tsutsumi et al. (1992), observaram que atividade da G6PDH foi menor durante o processo de maturação, sendo observado antes da ovulação um aumento da atividade da mesma, apesar de não se entender completamente como a enzima G6PDH desenvolve todo o seu processo de degradação. Alm et al. (2005), sugeriram que o ACB funcionaria como acceptor de elétrons durante a oxidação da glicose-6-fosfato e redução de NADP⁺ na presença suficiente atividade de G6PDH durante via das pentoses fosfato (PPP).

Também se destaca a atividade da G6PDH que ao decorrer do crescimento do oócito aumenta consideravelmente e demonstra que existe relação entre o diâmetro do oócito e a atividade da enzima G6PDH. No entanto, quando o gameta atinge aproximadamente 85µm de diâmetro a atividade enzimática é interrompida, ou seja, o oócito continua aumentando de volume enquanto que a atividade da enzima (G6PDH) atinge o ápice (ALCOBA, 2007).

Uma alternativa eficaz na seleção de oócitos bovinos é a classificação pela atividade da enzima (G6PDH), com base na coloração por um corante ACB que pode ser usado para medir a real capacidade de desenvolvimento do oócito (ALM et al., 2005). Sendo que alguns resultados de pesquisas indicam a

eficiência do corante (ACB) no aumento da produção de blastocisto durante a fertilização *in vitro* (ALM et al., 2005).

2.5. Seleção de oócitos pelo método Azul Cresil Brilhante (ACB)

Na busca por métodos não invasivos de seleção de CCOs, o corante Azul Cresil Brilhante (ACB) tem sido utilizado após seleção morfológica com resultados positivos quanto à produção de blastocistos em diversas espécies.

O ACB é um corante vital que é reduzido a uma substância incolor pela ação de G6PDH e pode, portanto, ser utilizada para mensuração da atividade intracelular desta enzima (ALM et al., 2005). Apesar de ainda não ser completamente entendido de que maneira a enzima G6PDH é capaz de degradar o corante no interior do oócito, tornando seu citoplasma incolor (Figura 1), Alm et al. (2005) sugeriram que o ACB funcionaria como um aceptor de elétrons durante a oxidação da glicose-6-fostato e redução de NADP⁺ na presença de suficiente atividade de G6PDH durante via das pentoses fosfato (PPP).

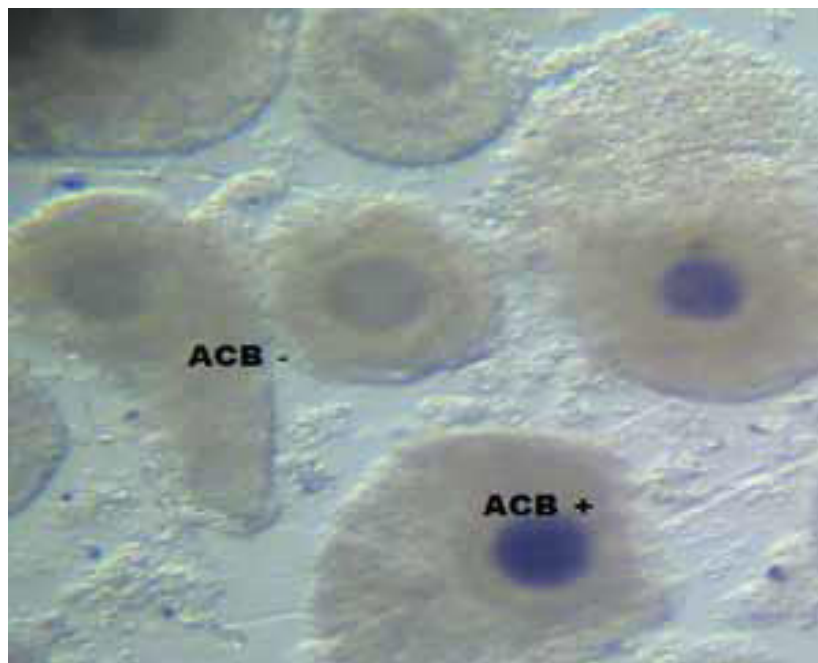


Figura 1: Demonstração dos oócitos corados (ACB+) e não corados (ACB-) após serem expostos a 60 min ao corante Azul Cresil Brilhante (ACB). Fonte: OTERO et al., 2017.

O emprego do corante ACB logo após a seleção morfológica de oócitos está sendo utilizado como alternativa a métodos invasivos de avaliação de qualidade dos mesmos (ALM et al., 2005). Este método facilita a seleção dos oócitos completamente desenvolvidos (corados em azul) daqueles em desenvolvimento (não corados) (ROCA et al., 1998).

Alguns estudos têm demonstrado que oócitos imaturos que apresentam maior diâmetro (e menor atividade enzimática de G6PDH), em bovinos (ALM et al., 2005; PUJOL et al., 2004) caprinos (RODRIGUEZ-GONZALEZ et al., 2003) suínos (SHOURBAGY et al., 2006) e camundongos (WU et al., 2007) são corados pelo ACB sem alterar a sua competência de maturação e fertilização, constituindo uma ferramenta potencial de seleção de oócitos mais competentes.

Alm et al. (2005) verificaram que embriões originados de oócitos corados (ACB+) apresentaram maior número de células que os não corados (ACB-). Da mesma maneira, o ACB se mostra promissor na seleção de oócitos que serão utilizados como receptores de células para a técnica de transferência nuclear de células somáticas (TNCS) em bovinos. Bhojwani et al. (2007) observaram que o corante se mostrou efetivo e influenciou positivamente as taxas de blastocisto e número de células embrionárias de embriões produzidos por TNCS.

Em búfalas, Manjunatha et al. (2007) verificaram que quanto às taxas de maturação nuclear, de formação dos dois pró-núcleos, de clivagem e blastocisto, os oócitos ACB+ foram mais competentes que os ACB-. Além disso, a taxa de polispermia em oócitos incolores foi maior que em ACB+, demonstrando provável distúrbio na função dos grânulos corticais em oócitos ACB-.

Apesar de Alm et al., (2005), Bhojwani et al., (2007) e Manjunatha et al. (2007) terem obtido maiores taxas de blastocisto em oócitos ACB+ quando comparado ao grupo controle (apenas seleção morfológica) alguns estudos, no entanto, não têm confirmado tal hipótese. Em oócitos bovinos, Opiela et al. (2008) encontraram taxas de blastocisto de oócitos ACB+ semelhantes ao grupo controle. Da mesma maneira, a taxa de eclosão dos embriões de ambos os grupos não apresentou diferença. Mota (2008) também não obteve maiores

taxas de clivagem e blastocistos bovinos a partir de oócitos ACB+ quando comparado ao grupo controle.

Em caprinos, Katska-Ksiazkiewicz et al., (2007) também não encontraram otimização na seleção dos CCOs através do corante ACB quando comparado a seleção morfológica. Segundo esses autores, a seleção morfológica acurada, por si só, já seria capaz de distinguir oócitos mais competentes.

Apesar do uso do corante ACB logo após a seleção morfológica ser questionável, quando comparado à seleção morfológica criteriosa, seguramente todos os trabalhos demonstram que atividade da enzima G6PDH está inversamente relacionada à competência de desenvolvimento dos oócitos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Selecionar oócitos imaturos bovinos pelo método Azul Cresil Brilhante (ACB) para a maturação *in vitro* (MIV).

3.2 Objetivos específicos

- Classificar morfológicamente os oócitos encontrados, testando a eficiência do corante ACB;
- Avaliar as taxas de oócitos classificados morfológicamente e corados em ACB+ e ACB-.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coletas de Ovários

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal do Maranhão - Campus Chapadinha. Os ovários foram obtidos a partir de um abatedouro localizado à 16 km da universidade, portanto, as fêmeas se encontravam em fase aleatória de ciclo estral. Após o abate e evisceração dos animais, os ovários foram removidos e imersos em solução salina (NaCl, 0,9%) acrescida de sulfato de estreptomicina (100 mg/L) em temperatura ambiente. Ao término da coleta, os ovários foram transportados para o laboratório e o período entre o abate e o início da aspiração não foi superior a 3 horas.

4.2. Punção folicular e classificação morfológica dos CCOs

No laboratório, os ovários foram lavados com uma nova solução de transporte e mantidos em banho-maria a 37°C, os folículos visíveis com diâmetro variando de 3 a 12 mm foram puncionados utilizando uma agulha 20G acoplada a uma seringa de 5,0 ml. O líquido folicular contendo os oócitos foram acondicionados em tubos de 10 ml, contendo solução tampão fosfato (mPBS, Nutricell[®]) aquecido a 37°C. Ao final da punção dos folículos, um tempo de cinco minutos foi respeitado para a decantação dos oócitos. Posteriormente, com auxílio da pipeta de Pasteur, o pellet contendo ovócitos foi recuperado e transferido para uma placa de Petri (90x15mm), e realizada a recuperação dos oócitos e transferidos para meio de manutenção (TQC, Nutricell[®]) aquecido a 37°C.



Figura 2: Imagens ilustrativas dos preparativos para aspiração folicular (1), ovários selecionados para aspiração (2), aspiração folicular (3), líquido folicular aspirado, seleção dos oócitos (4) e corante ACB diluído em PBS (5).

Em seguida na Figura 3, os oócitos foram classificados sob estereomicroscópio por critérios morfológicos em quatro graus conforme Viana et al. (2004):

Grau I (três ou mais camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo);

- Grau II (uma ou duas camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo);
- Grau III (camada incompleta de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo ou heterogêneo);
- Grau IV (células do *cumulus* com aspecto gelatinoso ou oócito degenerado com grânulos escuros);

No experimento, foram utilizados CCOs em todos os graus de classificação.

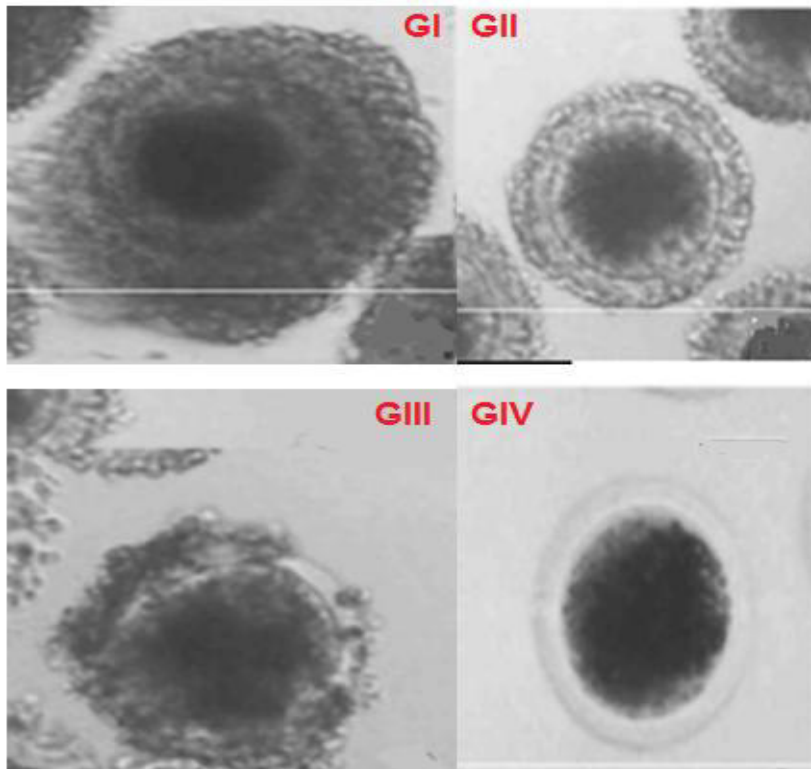


Figura 3: Classificação de acordo a camada do *cumulus*, Graus I, II, III e IV.

4.3. Classificação de oócitos pelo método ACB

Imediatamente após a classificação morfológica, os oócitos selecionados foram lavados em gotas 100 μL de mPBS (Nutricell[®]), e incubados em gotas de 200 μL de ACB (26 μM , Sigma, EUA) diluído em PBS em placas de petri (60x15mm), uma gota para cada grau de classificação (GI, GII, GIII e GIV) sobre placa aquecedora à 38°C por 60 min (MANJUNATHA et al., 2007). Decorrido esse tempo, os oócitos foram lavados novamente em gotas 3 de PBS (100 μL), com o objetivo de remover todo o corante dos gametas, e, visualizados sob estereomicroscópio com magnitude de 50x. Assim, como ilustrado abaixo na Figura 4 e Quadro 1, oócitos com coloração azul em seu citoplasma foram classificados como ACB+ e considerados viáveis (maior potencial de desenvolvimento para MIV e PIVE). Já àqueles com citoplasma incolor foram classificados como ACB- considerados não viáveis (OPIELA e KATSKA-KSIAŹKIEWICZ, 2013).



Figura 4: Imagens de oócitos submetidos à coloração com ACB. Oócitos corados (ACB+) e não corados (ACB-) (A e B).

Quadro 1: Relação do ACB (Azul Cresil Brilhante) em cada etapa de coloração.

	ACB +	ACB -
Coloração	Positivo (azul)	Negativo (incolor)
Atividade G6PDH	Menor	Maior
Crescimento (maturação)	Favorável	Desfavorável
Potencial para PIVE	Favorável	Desfavorável

4.4 Análise estatística

Os dados foram analisados no software Statistical Analysis System for Windows SAS® (SAS, 2001). Os resultados foram expressos em médias percentuais, analisados pelo teste exato de Fisher. O nível de significância adotado para rejeitar H₀ (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05 considerou-se que houve diferença estatisticamente significativa.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme apresentado na tabela 1, ao avaliar da taxa de corados e não corados dentro de cada grupo de classificação dos oócitos, observou-se que, dentro do grupo de oócitos classificados morfologicamente como GI, o percentual de oócitos ACB+ foi significativamente maior que o percentual de ACB- ($P < 0,05$). Oócitos classificados como GI, provenientes de folículos que já completaram seu desenvolvimento, apresentam menor atividade da enzima G6PDH (MANGIA e EPSTEIN, 1975; WANG et al., 2012). Sendo assim, o maior percentual de oócitos com citoplasma azulado neste grupo corresponde a baixos níveis de atividade específica da enzima G6PDH.

Alm et al. (2005) e Mota (2008) assim como em nosso estudo, testaram o corante em CCOs bovinos aspirados de ovários de animais de abatedouro, encontram taxas de 58% (ACB+), 42% (ACB-) e 60% (ACB+), 40% (ACB-) em oócitos classificados morfologicamente como competentes. Resultados semelhantes também foram encontrados por Manjunatha et al. (2007), que utilizando oócitos de búfalas submetidos à mesma concentração de ACB (26 μ M) diluído em mPBS durante o período de 90min de exposição, obtiveram taxas de 57% de oócitos ACB+ e 43% de oócitos classificados como ACB-. Diferente do presente experimento, os estudos citados expuseram os CCOs a solução de ACB diluído em mPBS, em estufas incubadoras sob condições de atmosfera umidificada e não sobre placa aquecedora em condições de umidade ambiental.

De acordo com as taxas descritas e comparadas neste trabalho, a exposição dos CCOs ao ACB em placas de Petri sobre placa aquecedora, não comprometeu a interação entre a G6PDH e o corante em oócitos GI, classificados como viáveis.

Tabela 1: Taxa de coloração de oócitos expostos ao corante Azul Cresil Brilhante por 60 min imediatamente após seleção morfológica.

Classificação Morfológica	ACB+ (%)	ACB- (%)	Valor de P
GI	26/40(65%)	14/40(35%)	0,0134
GII	50/123(40,6%)	73/123(59,4%)	0,0049
GIII	59/108(54%)	49/108(46%)	0,2606
GIV	17/57(29,8%)	40/57(70,2%)	0,0001

($P < 0,05$) representa diferença estatística ao nível de 5% de significância.

Os oócitos classificados morfológicamente como GII também são considerados viáveis, mas, neste grupo, foi encontrado um maior percentual de oócitos ACB- ($P < 0,05$, tabela 1).

O grau de classificação de CCOs pode influenciar na coloração ou não do oócito, contudo, além do grau de classificação, outros fatores podem também influenciar na eficiência do corante, tais como maturidade sexual e perfil hormonal das fêmeas (WU et al., 2007). Podendo ainda estar relacionado com o diâmetro dos oócitos (KAUFFOLD et al., 2005), com a heterogeneidade entre os animais abatidos (CASTANEDA et al., 2013) ou com o diâmetro dos folículos (ALM et al., 2005). Oócitos recuperados de ovários de animais de abatedouro são heterogêneos, provenientes de folículos em diferentes estágios de crescimento e atresia (ROCA et al., 1998.), fato esse ocorrido no determinado estudo.

O percentual de ACB+ e ACB- foram similares dentro do grupo de CCOs GIII ($P < 0,05$, tabela 1), e taxa de ACB- significativamente maior grupo GIV ($P < 0,05$, tabela 1), conforme esperado, uma vez que estes, são CCOs considerados não viáveis, podendo ser muitas vezes desnudos e/ou degenerados (VIANA et al., 2004), expandidos, ou CCOs que não tenha completado seu crescimento sendo capazes de reduzir o composto azul pela alta atividade da G6PDH, o que resulta em um oócito de citoplasma incolor (ALM et al., 2005).

Podemos considerar que, nos CCOs classificados em grau I, os níveis e/ou a atividade da G6PDH dos CCOs em PBS não alteraram ao longo de 1 hora em condições de atmosfera e umidade sem controle, diferente do que ocorreu nos CCOs classificados em grau II. Onde, ao comparar o percentual de corados e não corados entre os graus de classificação oocitária, verificou-se a taxa de ACB+ foi significativamente maior nos graus I e III ($P < 0,05$, tabela 1). E consequentemente os graus II e IV apresentaram maiores taxas de CCOs ACB- ($P > 0,05$, tabela 1).

Provavelmente, o tempo de exposição dos CCOs ao ACB fora da estufa pode ter influenciado nesta menor taxa de coloração sobre tudo nos oócitos de grau II, podendo ocorrer início de degeneração dos CCOs e alteração nos níveis ou a atividade da enzima G6PDH, considerando que CCOs ACB+ apresentam menor atividade desta enzima, tornando-se corados ao término da exposição (ALM et al., 2005).

6. CONCLUSÃO

O método de seleção oocitária ACB, selecionou oócitos mais competentes (ACB+) classificados em Grau 1, embora não tenha sido capaz de selecionar oócitos viáveis classificados em Grau 2. Deste modo o método de coloração ACB foi atenuado por situações adversas de temperatura e umidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G.P. Padrão comparativo de desenvolvimento folicular e seleção em ruminantes. **Journal Reproductive Fertility**, v.54, p.17-32.1999.

ALCOBA, D.D.; SILVA, I.S.B.; CORLETA, H.V.E. Utilização do corante azul cresil brilhante como método de seleção de oócitos humanos destinados à maturação in vitro. Universidade federal do Rio Grande do Sul. **Programa de pós-graduação em ciências biológicas: fisiologia**, p.36-63. 2007.

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

ALVAREZ, G. M. Immature oocyte quality and maturational competence of porcine cumulus-oocyte complexes subpopulations. **Biocell**, v. 33, n. 3, p. 167-177, 2009.

AZEVEDO, T. I. K., MAGALHÃES, L. F., OLIVEIRA, F. C., LIMA, G. P., & MAGALHÃES, G. M. (2015). A relação da evolução das técnicas de criação e o advento das biotecnologias da reprodução com a incidência de distocias em bovinos. **Investigação**, v.14, p.91-97. 2015.

BAKER, T.G.; FRANCHI L. L. A estrutura fina de cromossomos em oócitos primordiais bovina. **Journal Reproductive Fertility**, v.14 p.511-513, 1967.

BAKER, T.G.; HUNTER R.H.F. Oogênese e crescimento folicular na vaca: implicações para a superovulação. In: Sreenan JM (Ed): Controle da reprodução na vaca. Luxemburgo, **CEC Publicações**. p.34-49, 1978

BASSO, A.C.; ESPER C. R. Isolamento e caracterização ultraestrutural de folículos pré-antrais de vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). **Brazilian Journal Veterinaer**. v.39, p. 311-319, 2002.

BERTAGNOLLI, A.C.; GONÇALVES, P.B.D.; GIOMETTI, I.C ; COSTA, L.F.S.; OLIVEIRA, BEVERS, M.M. Regulação e modulação da maturação do oócito na bovino. **Theriogenology**, V.47, n.1, p.13-22, 1997.

BEVERS, M. M. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, New York, v. 47, p. 13-22, 2000.

BHOJWANI, S.; ALM, H.; TORNER, H.; KANITZ, W.; POEHLAND, R. Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear transfer. **Theriogenology**. v.67(2), p. 341-345. 2007.

BLONDIN, P. Logistics of large scale commercial IVF embryo production. Reproduction, **Fertility and Development**, v.29, p.32–36. 2017.

BLUME, H.; VALE FILHO, V. R.; MARQUES JÚNIOR, A. P.; SATURNINO, H. M. Incidência dos diferentes tipos morfológicos de oócitos bovinos obtidos de ovários colhidos em matadouro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 23, p. 258-259, 1999.

BOLS, P. E. J.; VANSOOM, A.; VANDENHEEDE, J. M.; KRUIF, A. Transvaginal ovum pickup (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. **Theriogenology**, USA, v. 43, p. 677-687, 1995.

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

BRACKETT B.G. O desenvolvimento embrionário e manipulação na produção animal. London: **Portland Press**. V.32, p.59-76, 1992.

CARROCERA, S., CAAMAÑO, J. N., TRIGAL, B., MARTÍN, D., & DÍEZ, C. Developmental kinetics of in vitro-produced bovine embryos: an aid for making decisions. **Theriogenology**, v.85(5), p.822-827.2016.

CASTANEDA, C. A. Lipid content, active mitochondria and brilliant cresyl blue staining in bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 79, p. 417-422, 2013.

CETICA, P.; PINTOS, G.; DALVIT, L.; BECONI, M. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. **Reproduction**. v.124(5), p.675-81.2002.

CHAGAS, V.M.; VIDAL E SILVA, M.A.; MARTINS, J.H.; SANTOS, C.S.; AGUIAR, H.M.V.S.B.; BARROS, C.H.S.C.; CHAVES, R.M. ; TORRES JÚNIOR, J.R.S. .Fatores anatomo-fisiológicos que afetam a qualidade oocitária em bovinos. **Pesq. Vet. Bras**. V.34, p.34-38, 2014.

CHEUN, L.H. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in erythrocytes of experimental animals. **Journal Clinic Pathology**, v.19, p.614-616, 1966.

CHIAN, R.C.; NIWA, K.; SIRARD, M.A. Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes in vitro. **Theriogenology**, v.41, p.1499-1508, 1994.

COELHO, L.A.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; VANTINI, R.; SILVA FILHO, I.R.; ALMEIDA Jr, I.L. Avaliação das condições de maturação oocitária e do efeito do reprodutor na produção in vitro de embriões bovinos. **Brazilian Journal Veterinária**. v. 35, n. 3, p. 120-122, 1998.

COSTA, E. P. Aspectos morfológicos (citológicos e ultraestruturais) e desenvolvimento de ovócitos de bovinos in vitro. Belo Horizonte: **UFMG**. v.16, p.235-245, 1994.

COTICCHIO, G. What criteria for the definition of oocyte quality. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1034, n. 1, p. 132-144, 2004.

DADARWAL, D.; ADAMS, G. P.; HYTTEL, P.; BROGLIATTI, G. M.; CALDWELL, S.; SINGH, J. Organelle reorganization in bovine oocytes during dominant follicle growth and regression. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.13, p.124, 2015.

DE BEM, A. R. Isolamento mecânico de folículos pré-antrais de ovários de vacas Nelore. **Arquivos da Faculdade de Veterinária-UFRGS**, Porto Alegre, v. 25, n.1, 1997.

DE BEM, T.H.C.; ADONA, P.R.; BRESSAN, F.F.; MESQUITA, L.G.; CHIARATTI, M.R.; MEIRELLES, F.V.; LEAL, C.L.V. The influence of morphology, follicle size and Bcl-2 and Bax transcripts on the developmental competence of bovine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**. Linköping. v.49, p.576-583, 2014.

DE LOOS, F.; MAURIK, V. P.; BENEDEN, V. T.; THAMA, K. Structural aspects of bovine oocyte maturation in vitro. **Mol Reprod Dev**. V.31, p.208–214. 1992.

DE SCHEPPER, G.G.; VAN NOORDEN, C.J.; HOUTKOOPEER, J.M. Age-related change of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in mouse oocytes. **Journal Histochem**; v.19, p.467–470. 1987.

DENIS, R. Aspiración folicular in vivo (opu) una nueva perspectiva en el campo de las biotecnologías de la reproducción. **Ciencia y Tecnologia Ganadera**. v.2 (2), p.57-70. 2008.

DIELEMAN, S. J.; HENDRIKSEN, P.J .; VIUFF, D.; THOMSEN, P.D.; HYTTEL, P.; KNIJN, H.M.; WRENZYCKI, C.; KRUIP, T.A.; NIEMANN, H.; GADELLA, B.M.; BEVERS, M.M.; VOS P.L. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**. V.57(1),p.5-20. 2002.

DODE, M.A.N. Avanços na maturação ovocitaria em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, suple. 1, p.115-130,2006.

EALY, A. D.; DROST, M.; HANSEN, P. J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **Journal of Dairy Science**. v.76, p.2899-2905, 1993.

EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. **Biology of Reproduction**. v.55, p.340-346, 1996.

EPPIG, J. Controle ovócitos do desenvolvimento folicular ovariano e função nos mamíferos. **Reprodução**, v.122, n.6, p.829-838, 2001.

ERICKSON B.H. Desenvolvimento e senescência do ovário bovino pós-natal. **J Animal Science**. v.25, p.800-805.1966.

ERICSSON, S.A.; BOICE, M.L.; FUNAHASHI, H.; DAY, B.N. Assessment of porcine oocytes using brilliant cresyl blue. **Theriogenology**. v.23,p.39:214.1993

FAIR, T. follicular e aquisição de competência para o desenvolvimento. **Anim Reprod Science**. V.78, p.203-216,2003.

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

FERNANDEZ, A.; CABRERA, P.; DIAZ, T.; RUIZ, A.; MARTINEZ, G. Efeito do estado reprodutivo de vacas mestiças Zebu sobre a produção de embriões in vitro. **Rev. Fac. Cienc. Vet.** vol.53 no.2 Maracay em dezembro, 2012.

FERRANDI, B.; CREMONESTI, G.; CONSIGLIO, A.L.; LUCIANO, A.M.; GANDOLFI, F.; MODINA, S.; CARNEVALI, A.; PORCELLI, F. Microdensitometric assay of enzymatic activities in parthenogenetically activated and in vitro fertilized bovine oocytes. **Acta Histochem.** v.104, p.193–198. 2002.

FERRO, F. R. A.; CAVALCANTI NETO, C. C.; TOLEDO FILHO, M. R.; FERRI, S. T. S.; MONTALDO, Y. C. Efeito do estresse calórico no desempenho reprodutivo de vacas leiteiras. **Revista Verde**, v.5, n.5, p.01-25 (Numero Especial), 2010.

FORTUNE, J.E.; CUSHMAN, R.A.; WAHL, C.M.; KITO, S. The primordial to primary follicle transition. **Mol. Cell. Endoc.** 163:53-60, 2000.

GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; ARMSTRONG, D.T. Oocyte–somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal reproduction Science**. v.32, p.431–446.2004.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; DONADEU, F.X.; KOT, K. Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction**, v. 65, p.639-647, 2001.

GONÇALVES, P.B.D.; HERNANDEZ, A.G.; RUBIN, M.I.B. et al. Função da proteína quinase C na maturação nuclear em oócitos bovinos. **Revista de Zootecnia**, v.32, p.42, 1994.

GONG, J.G.; CAMPBELL, B.K.; BRAMLEY, T.A.; GUTIERREZ, C.G.; PETERS, A.R.; WEBB, R. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. **Biol Reprod**, v.55, p.68-74, 1996.

GOOVAERTS, I.; LEROY, J.L.; JORSSSEN, E.P.; BOLS, P.E. Noninvasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte culture. **Theriogenology**. v.74(9), p.1509-1520.2010.

GORDON, I. Recovering the bovine oocyte. In: Laboratory production of cattle embryos (Biotechnology in Agriculture No. 27). 2nd ed. Cambridge, UK: **CAB International/Cambridge University Press**. p.79–111. ; 2003.

GOSDEN R.G; BOLAND N.I.; SPEARS N.; MURRAY A.A.; CHAPAMN M.; WADE J.C.; ZOHDY N.I. The biology and technology of follicular oocyte development in vitro. **Revista Reprod Med.** v.2, p.29-152, 1993.

GOTTARDI, F.P.; MINGOTI, G.Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.33, n.2, p.82-94. 2009.

GUERRA, M. M. P. Maturação in vitro de ovócitos caprinos. 127 p. **Tese (Doutorado) Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 1998.

QUINTER, O.J.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; DONADEU, F.X.; and KOT, K., HAGEMAN L.J. Influência do folículo dominante em oócitos de folículos subordinados. **Theriogenology**,v.51, p.449-459 , 1999.

HAN, Z.B .; LAN, G.C.; WU, Y.G.; HAN, D.; FENG, W.G.; WANG, J.Z.; TAN, J.H . Interactive effects of granulose cell apoptosis, follicle size, cumulus-oocyte complex morphology, and cumulus expansion on the developmental competence of goat oocytes: a study using the well-in-drop culture system. **Reproduction.** V.132(5):749-58. 2006.

HAWK, H.W.; WALL, R.J. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. **Theriogenology.** v. 41, p- 1571-1583, 1994.

HYTEL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **J. Reprod. Fertil.**, v.38, p.35-47, 1989.

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

J.F.C.;GONÇALVES, I.D.V. ; BARRETO, K.P.; EMANUELLI, I.P. ; BORGES, L.F.K. Interação entre células do cumulus e atividade da proteína quinase C em diferentes fases da maturação nuclear de oócitos bovinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, n.4, p.488-496, 2004.

KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; OPIELA, J.; RYNSKA, B.. Effects of oocyte quality, semen donor and embryo co-culture system on the efficiency of blastocyst product ion in goats. **Theriogenology** 68: 736-744. 2007.

KAUFFOLD, J. The in vitro developmental competence of oocytes from juvenile calves is related to follicular diameter. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n. 3, p. 325-332, 2005.

LEQUARRE, A.S.; VIGENRON, C.; RIBAUCCOUR, F.; HOLM, P.; DONNAY, I.; DALBIES-TRAN, R.; CALLESEN, H.; MERMILLOD, P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. **Theriogenology** , v.63, p.841-859. 2005.

- MADISON, V.; AVERY, B.; GREVE, T. Selection of imature bovine oocytes for developmental potential in vitro. **Animal Reproduction Science**, v.27, p.1-11, 1992.
- MALARD, P. F. Coleta, maturação, fecundação e cultivo in vitro de ovócitos de bezerras da raça Nelore de 2 a 3 meses de idade. **Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v.43, p.47-49 2000.
- MALAYER, J. R.; HANSEN, P. J, BUHI, W. C. Effect of day of o estrus cycle, side of the reproductive tract and heat shock on in vitro protein secretion by bovine endometrium. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.84, p.567-578, 1988.
- MANGIA, F.; EPSTEIN, C.J. Biochemical studies of growing mouse oocytes: preparation of oocytes and analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase activities. **Developmental Biology**. V.45(2), p.211-220. 1975.
- MANJUNATHA, B.M.; GUPTA, P.S.; DEVARA, J. M.; RAVINDRA, J.P.; NANDI, S. Selection of developmentally competent buffalo oocytes by brilliant cresyl blue staining before ivm. **Theriogenology**. v.68(9),p.1299-1304. 2007.
- MAPLETOFT, R.J; HASLER, J.F. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. **Revista Science Tech Off Int Epizoot**, v.24, p.393-403. 2005.
- MIHM, M.; BLEACH, E.C.L. Regulação endócrina do desenvolvimento de folículos antrais de ovário em bovinos. **Anim Reprod Sci**; v.78, p.217-237, 2003.
- MOTA, G B. Desenvolvimento e expressão gênica em oócitos bovinos imaturos selecionados por azul cresil brilhante. **Programa de Pós-graduação em Zootecnia**. v.234, p.54-67.2008.
-
- NEMCOVA, L.; MACHATKOVA ,B. M.; HANZALOVA, B. K.; HORAKOVA, B. J.; KANKA, J. Gene expression in bovine embryos derived from oocytes with different developmental competence collected at the defined follicular developmental stage. **Theriogenology**. v.65 .p.1254–1264. 2006.
- NILSSON, E.; PARROT, J.A.; SKINNER, M.K.; Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculoogenesis. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.175, p.123-130, 2001.
- NIVET, A. L., BUNEL, A., LABRECQUE, R., BELANGER, J., VIGNEAULT, C., BLONDIN, P., & SIRARD, M. A. FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. **Reproduction**. V.143(2), p.165-171. 2012.
- OPIELA, J., KATSKA-KSIAŻKIEWICZ, L. The utility of brilliant cresyl blue (BCB) staining of mammalian oocytes used for in vitro embryo production (IVP). **Reproductive Biology**. V.13(3), p.177-183. 2013.

OTERO, A. R.; DA COSTA, P. E.; PEREIRA, M. E. Maturação nuclear in vitro de ovócitos bovinos selecionados pelo método azul cresil brilhante. **Rev Colombiana Cienc Anim**; v.9(Supl 2):p.345-354. 2017.

PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytederived from different categories of antral follicles. **Mol. Reprod. Devel.**, v.31, p.63-67, 1992.

PEREIRA, M. M.; BATISTA, R. I. T. P.; WOHLRES-VIANA, S.; BOITÉ, M. C.; SERAPIÃO, R. V.; POLISSENI, J.; IGUMA, L. T.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M. Relação entre qualidade morfológica de complexos cumulus-oócitos bovinos e potencial de desenvolvimento in vitro. UFRGS,. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, supl. 3, p. s1182, 2007.

PICTON, H. M. Activation of follicle development: The primordial follicle. **Theriogenology**. v. 55, p. 1193-1210, 2001.

PIVATO, I. Efeito de diferentes tratamentos hormonais e nutrição no donnors de oócitos em in vitro de embriões bovinos. Tese. **Universidade Federal de Pelotas**. V.32, p.23-28,2001.

PUJOL, M.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; PARAMIO, M.-T. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. **Theriogenology**, v. 61, n. 4, p. 735-744, 2004.

QUEZADA-CASASOLA, A.; MARTÍNEZ-ARMENDÁRIZ, K.E.; ITZÁ-ORTIZ, M. F.; ESCÁRCEGA-ÁVILA, A. M.; PÉREZ-EGUÍA, E.; FILIPIAK, Y.; LARocca, C.; CARRERA-CHÁVEZ J. M. Effect of presence of corpora lutea on cumulus expansion of in vitro matured bovine oocytes selected by trypan blue and brilliant cresyl blue tests. **Journal of Applied Animal Research**, v.46, p. 967–972. 2018.

RAMOS, A. A.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; HENRY, M.R.J.M. Protocolos de produção in vitro de embriões na raça Gir. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. v.58, n.3, p.341-347, 2006.

ROCA, J.; MARTINEZ, E.; VASQUEZ, J.M.; LUCAS, X. Selection of imature pigocytes for homologous in vitro penetration assays with the brilliant cresyl blue test. **Reproduction Fertility Development**. v.10, p.479-485, 1998.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, E.; LÓPEZ-BEJAR, M.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M.T. Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue and matured with cysteamine supplementation. **Reprod Nutr Dev**. v.43(2), p.179-87.2003.

ROSA E SILVA, A. C. J. S. Produção de oócitos em mamíferos adultos: o camundongo como modelo. **Reprodução & Climatério**. v.8(3), p.104–107.2013.

ROSA, P. R. A. ; BOHRER, R. C.; LUDKE, C. A. ; DE CESARO, M. P.; PEREIRA, G.R. ; MONDADORI, R. G.; ANTONIAZZI, A. Q. ; GONÇALVES, P. B.

D. Grb10 characterization in bovine cumulus oocyte complexes from different follicle sizes. **Cienc. Rural Animal Reproduction**. v.45, p.12-23.2015.

ROSE-HELLEKANT, T.A.; BAVISTER, B.D. Roles of protein kinase A and C in spontaneous maturation and forskolin or 3-isobutyl-1-methylxanthine, maintained meiotic arrest of bovine oocytes. **Mol. Reprod. Devel.** v.44,p.241-249, 1996.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1898-1906, 2004.

ROTH, Z.; MEIDAN, R.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.120, p.83-90, 2000.

RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca anatomica**. v.24,p.77–92.1983.

SADEU, J.C.; CORTVRINDT, R.; RON-EL, R.; KASTERTEIN, E.; SMITZ, J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured froze-thawed human fetal ovarian tissue. **Fert. Ster.** V.85(1), p.1130-1141, 2006.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. **Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária**. v.12, p.234-254.1998.

SHIOYA, Y.; KUWAYAMA, M.; FUKUSHIMA, M. In vitro fertilization and cleavage capability of follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. **Theriogenology**. v.30, p.489-489, 1998.

SHOUBARGY, S.H.E.; SPIKINGS, E.; FREITAS, M.; JOHN, J.C.S. Mitochondria directly influence fertilization outcome in pig. **Reproduction**. v.131, p.233-245. 2006.

SMITZ, J.E.J; CORTVRINDT R.G. THE earliest stages of folliculogenesis in vitro. **Reproduction**, v.123, p.185-202, 2002.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. **SAS/STAT software**, Version 8.02, Cary: 2001.

SU, J. Oocytes selected using BCB staining enhance nuclear reprogramming and the in vivo development of SCNT embryos in cattle. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. 36-81.2012.

SÜSS, U.; WÜTHRICH, K.; STRANZINGER, G. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes maturation in vitro. **Biol. Reprod.**, v.38, p.871-880, 1988.

SUTTON, M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Beffects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus–oocyte complex and its

influence on oocyte developmental capacity. **Human Reproduction Update**. v.12, p.935–48.2003.

TORNER, H. Molecular and subcellular characterisation of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Reproduction**, v. 135, n. 2, p. 197-212, 2008.

TSUTSUMI, G.J; SATOH, K.; TAKETANI, Y.; KATO,T. Determination of enzyme activities of energy metabolism in the maturing rat oocyte. **Molecular Reproduction and Development**, v.33, p.333-337, 1992.

VAN DER HURK, R.; ZAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717-1757,2005.

VANDAELE,L.; MATEUSEN,B.; MAES,D.; KRUIF,A.; VAN SOOM, A. Temporal detection of caspase-3 and-7 in bovine in vitro produced embryos of different developmental capacity.**Reproduction**. v.133(4), p.709-718. 2007.

VANNUCCHI,C.I. Estudo da maturação nuclear in vitro de oócitos de cães em meios suplementados com hormônios e co-cultivo em células homologas da tuba uterina.Tese (Doutorado em Reprodução Animal)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, **Universidade de São Paulo**. v.234, p.234-345. 2003.

VARAGO , F.B; MENDONÇAS, L.F; LAGARES, M de A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Rev. Bras. de Reprod. Anim.** Belo Horizonte, v.32, n.2, p. 100-109, 2008.

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

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.,FERNANDES, Intervalos curtos entre a aspiração folicular guiada por ultrassonografia melhoram a qualidade do oócito, mas não impedem o estabelecimento de folículos dominantes na raça Gir (*Bos indicus*) de bovinos. **Reprodução Animal**.v.84,p.1-12,2004.

VIGNOLA, A.G.H. Regulação da maturação nuclear e expansão das células do cumulus pelas proteínas quinase A e C em oócitos bovinos. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – **Universidade Federal Santa Maria**. v.54, p.34-84,1995.

VIGNOLA, A.G.H.; PRADO, A.; VALENTE, A. Técnicas de coloração cromossômica para estádios específicos da maturação nuclear de oócitos bovinos. **Ciê. Rural**, v.24, p.583-589,1994.

WANG, Q.; SUN, Q. Y. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. **Reprod Fertil Dev**. v.19(1), p.1-12. 2007.

WASSARMAN, M. The mammalian ovum. In: Knobil E, Neil D, editors. The physiology of reproduction, vol. 1. New York, **USA: Raven Press**; p. 69–102. 1988.

WOLFENSON, D.; THATCHER, W. W.; BADINGA, L.; SAVIO, J. D.; MEIDAN, R.; LEW, B. J.; BRAW-TAL, R; BERMAN, A. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. **Biology of Reproduction**, v.52, p.1106-1113, 1995.

WONGSRIKEAO, P.; OTOI, T.; YAMASAKI, H.; AGUNG, B.; TANIGUCHI, M.; NAOI, H.; SHIMIZU, R.; NAGAI, T. Effects of single and double exposure to brilliant cresyl blue on the selection of porcine oocytes for in vitro production of embryos. **Theriogenology**. v.66, p.366–372.2006

WU, J. Luteinizing hormone has a stage-limited effect on pre-antral follicles development in vitro. **Biology of Reproduction**. v. 63, p. 320-327, 2000.

WU, Y.G.; LIU, Y.; ZHOU, P.; LAN, G-C.; HAN, D.; MIAO, D-Q.; TAN, J-H. Selection of oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining: a study using the mouse model. **Cell Research**.v.17. p. 722-731. 2007.

ZHANG, L.; JIANG, S.; WOZNIAK, P.J. et al. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. **Mol. Reprod. Devel**, v.40, p.338-344, 1995