



**UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DO  
MARANHÃO**

**PRÓ – REITORIA DE PESQUISA E PÓS – GRADUAÇÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS UTILIZANDO  
DILUIDOR COM ADIÇÃO DE INSULINA OU FATOR DE CRESCIMENTO  
SEMELHANTE À INSULINA TIPO 1 (IGF-1)**

**SÃO LUIS – MA  
2015**

**DOUGLAS LEMES DADALTO**

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS UTILIZANDO  
DILUIDOR COM ADIÇÃO DE INSULINA OU FATOR DE CRESCIMENTO  
SEMELHANTE À INSULINA TIPO 1 (IGF-1)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Animal.

**Área:** Reprodução e Conservação Animal

**Orientador**

Prof. Dr. Ricardo de Macêdo Chaves

**Co-orientador**

Prof. Dr. Felipe de Jesus Moraes Junior

**SÃO LUIS - MA  
2015**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos,  
desde que citada à fonte

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

Biblioteca da Universidade Estadual do Maranhão

**Dadalto, Douglas Lemes.**

*Produção in vitro de embriões bovinos utilizando diluidor com adição de insulina ou fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1))/Douglas Lemes Dadalto. – São Luís, 2015.*

52 f

Dissertação (Mestrado) – Curso em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Macêdo Chaves.

1. Insulina. 2. IGF-1. 3. Bovinos. 4. Produção *in vitro*

CDU: 636.2.082.4

**Dissertação de Mestrado aprovada em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2015 pela banca  
examinadora composta pelos seguintes membros:**

---

**Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza**

**1º Membro**

---

**Prof. Dr. Felipe de Jesus Moraes Junior**

**2º Membro**

---

**Prof. Dr. Ricardo de Macêdo Chaves**

**Orientador**

*Há mais mistérios entre o céu e a terra do que  
a vã filosofia dos homens possa imaginar*

**William Shakespeare**

## **AGRADECIMENTO**

**A Deus** pelas maravilhas da vida.

A minha **Família**, que sempre me apoiou nas minhas decisões, razão do meu viver.

Ao Prof. Dr. **Ricardo de Macêdo Chaves**, que me deu a oportunidade de desenvolver profissionalmente na área de reprodução animal.

Ao Dr. **Felipe de Jesus Moraes Junior**, que me orientou em todas as etapas da produção *in vitro*.

A todos do **Laboratório de Reprodução Animal**.

Aos **Amigos** do mestrado e da veterinária.

Ao Médico Veterinário **Hélio Fernandes Alves Monteles**, do abatedouro DA Vital.

A **CAPES** pela concessão da bolsa.

DADALTO, D. L. **Produção *in vitro* de embriões bovinos utilizando diluidor com adição de insulina ou fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1).** *In vitro* production of bovine embryos using thinner or with addition of insulin-like growth factor type 1 insulin (IGF-1). 2015. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Universidade Estadual do Maranhão, São Luís/MA, 2015.

## RESUMO

A produção *in vitro* de embriões bovinos apresenta baixas taxas de desenvolvimento embrionário quando comparadas à produção *in vivo*. Com o objetivo de avaliar o efeito na produção *in vitro* de embriões bovinos, foi adicionada Insulina e/ou Fator de crescimento semelhante à insulina tipo-1 (IGF-1) ao diluidor do sêmen. Ovários provenientes de abatedouros foram aspirados e selecionados somente Complexos cumulus oócitos (CCOs) grau I, II e III, e em seguida incubados por 24 horas a 38,8°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após a maturação, uma palheta de sêmen de cada tratamento (Controle, Insulina, IGF-1 e Insulina + IGF-1) foi descongelada e colocada em gradiente de Percoll para retirada da dose inseminante. Os gametas foram co-incubados de 18 a 22 horas e em seguida cultivados por sete dias. Decorridas 48 horas, foi avaliado a taxa de clivagem (D2), e sete dias após a taxa de blastocistos (D7). Foram aspirados 679 ovários, recuperados 671 oócitos grau I, 329 grau II e 152 grau III, distribuídos em seis repetições. Não houve diferença significativa para as taxas de clivagem. O tratamento Controle apresentou maiores taxas de desenvolvimento embrionário. O tratamento com Insulina resultou em maiores produções de mórulas (47,7%). Os tratamentos com IGF-1 e Insulina + IGF-1 apresentaram maiores taxas para o estágio de blastocisto inicial. O tratamento Controle resultou em maiores taxas de blastocisto expandido (51,0%). Não houve diferença estatisticamente ( $P > 0,05$ ) para qualidade grau I. O tratamento com IGF-1 apresentou maiores taxas (35,3%) para a qualidade grau II. Para a qualidade grau III o tratamento com Insulina (46,4%) foi superior. O tratamento Controle apresentou menor taxa de degenerados (45,1%) e maiores taxa de não fertilizados (54,9%). Portanto podemos concluir que adição de Insulina e/ou IGF-1 ao diluidor do sêmen não aumentou as taxas de clivagens e de blastocistos dos embriões produzidos *in vitro*, não melhorando a qualidade embrionária.

**Palavras-Chave:** Bovinos, IGF-1, Insulina, Produção *in vitro*.

DADALTO, D. L. **In vitro production of bovine embryos using thinner or with addition of insulin-like growth factor type 1 insulin (IGF-1).** Produção *in vitro* de embriões bovinos utilizando diluidor com adição de insulina ou fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1).. 2015. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Universidade Estadual do Maranhão, São Luís/MA, 2015.

### ABSTRACT

The *in vitro* production of bovine embryos has low embryonic development rates compared to production *in vivo*. In order to evaluate the effect on *in vitro* bovine embryo was added Insulin and / or growth factor insulin-like type-1 (IGF-1) to semen extender. Ovaries were aspirated from slaughterhouse and only selected cumulus oocyte complexes (COCs) grade I, II and III, and then incubated for 24 hours at 38.8 ° C and 5% CO<sub>2</sub>. After maturation, a semen straw from each treatment (control, insulin, IGF-1 and insulin + IGF-1) was thawed and placed in a Percoll gradient for removal of intrauterine insemination. The gametes were co-incubated 18 to 22 hours and then cultured for seven days. After 48 hours, the cleavage rate was assessed (D2), and seven days after blastocyst (D7). 679 ovaries were aspirated, 671 oocytes recovered grade I, grade II 329 and 152 grade III, over six repetitions. There was no significant difference for the cleavage rates. Treatment Control showed higher embryo development rates. Treatment with insulin resulted in higher production of morulae (47.7%). Treatment with IGF-1 and insulin + IGF-1 had higher rates for the early blastocyst stage. The control treatment resulted in larger expanded blastocyst rates (51.0%). There was no statistically difference ( $P > 0.05$ ) for quality grade I. Treatment with IGF-1 showed the highest rates (35.3%) for the quality grade II. For the quality grade III treatment with insulin (46.4%) was higher. Treatment Control showed lower degenerate rate (45.1%) and higher rate of unfertilized (54.9%). Therefore we can conclude that the addition of insulin and / or IGF-1 to the semen extender did not increase cleavage rates and blastocyst embryos produced *in vitro*, not improving embryo quality.

**Keywords:** Bovine, IGF-1, Insulin, Production *in vitro*



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
2.1. Obtenção e Recuperação de Complexos Cumulus Oócitos.....	15
2.2. Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	16
2.3. Fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	17
2.4. Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	19
2.5. Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo 1 (IGF-1).....	20
2.6. Insulina.....	23
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	22
3.1 Geral.....	22
3.2 Específicos.....	22
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
4.1. Local do Experimento e Coleta dos Ovários.....	23
4.2. Grupos Experimentais.....	23
4.3. Produção <i>in vitro</i> de Embrião.....	24
4.3.1. Punção Folicular e Seleção dos Complexos Cumulus Oócitos.....	24
4.3.2. Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	24
4.3.3. Fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	24
4.3.4. Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	25
4.4. Delineamento Experimental e Análise Estatística.....	26
<b>5. RESULTADOS</b> .....	27
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	30
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	33
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	34
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	35

## LISTAS DE QUADROS E TABELAS

### Página

**QUADRO 1.** Grupos experimentais (controle, insulina, IGF-1 e insulina+IGF-1), quantidade por mililitro e volume da palheta ajustada para  $25 \times 10^6$  espermatozóides vivos/mL..... 23

**TABELA 1.** Taxa de Clivagem e de Blastocistos de complexos cumulus oócitos (CCOs) de fêmeas bovinas submetidas à fecundação in vitro com adição de Insulina e/ou IGF-1 ao diluidor do sêmen..... 27

## LISTAS DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>FIGURA 1.</b> Taxa de desenvolvimento embrionário (%), com base no estágio de desenvolvimento, para embriões produzidos <i>in vitro</i> a partir de sêmen criopreservados com insulina e/ou IGF-1.....	28
<b>FIGURA 2.</b> Taxa de desenvolvimento embrionário (%), com base na qualidade morfológica para embriões produzidos <i>in vitro</i> a partir de sêmen criopreservados com insulina e/ou IGF-1.....	29
<b>FIGURA 3.</b> Taxa de degenerados (DEG) e não fertilizados (NF) (%), a partir de sêmen criopreservados com insulina e/ou IGF-1.....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**%**: Percentual  
**µm**: Micrometro  
**µL**: Microlitro  
**µUI/mL**: Micro unidades internacionais por mililitro  
**BSA**: Albumina sérica bovina  
**CCOs**: Complexos *cumulus* oócitos  
**CIV**: Cultivo *in vitro*  
**CO<sub>2</sub>**: Dióxido de carbono  
**CP**: Corpúsculo polar  
**EGA**: Ativação do genoma embrionário  
**EGF**: Fator de crescimento epidérmico  
**FGF**: Fator de crescimento de fibroblastos  
**FIV**: Fertilização *in vitro*  
**FSH**: Hormônio folículo estimulante  
**G**: Gaus  
**GAG**: Glicosaminoglicanos  
**GC**: Grânulos corticais  
**GLUT8**: Transportador de glicose  
**IETS**: Sociedade Internacional de Transferência de Embrião  
**IGF-1**: Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1  
**LH**: hormônio luteinizante  
**mg**: miligrama  
**III**: Metáfase II  
**MIV**: Maturação *in vitro*  
**mL**: Mililitro  
**mm**: Milímetro  
**ng/mL**: nano gramas por mililitro  
**O<sub>2</sub>**: Monóxido de carbono  
**PDGF**: Fator de crescimento derivados de plaquetas  
**pH**: Potencial de hidrogênio  
**PIV**: Produção *in vitro*  
**PVA**: Alcoolpolivinílico  
**PVP**: Polivinilpirrolidona  
**RNA**: Ácido ribonucleico  
**RNAm**: Ácido ribonucleico mensageiro  
**SFB**: Soro fetal bovino  
**SOF**: Fluido sintético de oviduto  
**TCM 199**: Meio de cultura de tecido  
**TNF**: Fator de crescimento de necrose tumoral  
**UI**: unidade internacional  
**VG**: Vesícula germinativa  
**X<sup>2</sup>**: Teste qui-quadrado  
**x g**: Força da gravidade  
**ZP**: Zona pelúcida

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho bovino do mundo com aproximadamente 213 milhões de cabeça (IBGE 2011). É o maior produtor de embriões bovinos, respondendo por quase um terço da produção mundial conforme a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) (THIBIER, 2007).

Segundo Baruselli *et al.* (2006), a eficiente multiplicação de animais superiores por biotecnologias da reprodução, pode proporcionar maior retorno econômico à pecuária nacional, visto que possibilita a disseminação de animais altamente produtivos de maneira rápida e eficaz.

Contudo a produção *in vitro* (PIV) de embriões ainda apresenta algumas limitações tais como baixas taxas de blastocisto, dificuldade na criopreservação dos embriões, menor viabilidade dos ovócitos, maior custo, bezerros com maior peso ao nascer, período de gestação mais longo, aumento na incidência de abortos, aumento da mortalidade perinatal e aumento de anormalidades congênitas (LEIBFRIED-RUTLEDGE, 1999; WAGTENDONK DE LEEUW *et al.*, 2000).

A utilização comercial da PIV ainda está limitada ao seu elevado custo, e vai depender do balanço entre o mérito genético e o custo de sua produção. Embora a produção *in vitro* de embriões bovinos seja muito difundida e empregada há algumas décadas, as taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro* ainda são significativamente inferiores, quando comparadas à situação *in vivo*, o que pode ser atribuído a deficiências nas maturações nucleares e citoplasmáticas, bloqueio do desenvolvimento embrionário, a composição dos meios de cultivo, a capacitação espermática, as condições de incubação estabelecidas e a qualidade dos oócitos e blastocistos produzidos *in vitro* comparados aos produzidos *in vivo* (ROCHA *et al.*, 2014).

O aprimoramento das condições de incubação pelo enriquecimento dos meios de cultivo com antioxidantes e/ou fatores de crescimento, podem resultar em melhorias na qualidade dos gametas e conseqüentemente na produção *in vitro* de embriões bovinos. Os fatores de crescimento desempenham papéis importantes na capacidade de desenvolvimento de oócitos e embriões de várias espécies (HARDY e SPANOS, 2002). Dentre eles, o Fator de crescimento semelhante à insulina - 1 (IGF-1) é um peptídeo pequeno de 70 aminoácidos com uma massa molecular de 7649 daltons (LARON Z, 2001) que regula a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (BENITO *et al.*, 1996; VINCENT *et al.*, 2002), promove a maturação dos oócitos por

desencadear a divisão mitótica das células da granulosa (SHABANKAREH e ZANDI, 2010), estimulando o crescimento dos blastocistos, aumentando a absorção da glicose (CARAYANNOPOULOS *et al.*, 2000) e prevenindo a apoptose (NEIRA *et al.*, 2010; PARIA e DEY, 1990; SHABANKAREH e ZANDI, 2010). É produzido em vários órgãos reprodutivos como hipotálamo, ovários, tubas uterinas e útero (SPICER e ECHTERNKAMP, 1995; WATSON *et al.*, 1999; DAFTARY e GORE, 2005). No entanto, a maior parte do IGF-1 circulante é produzida pelo fígado (PFAFFLM *et al.*, 1998; YAKAR *et al.*, 1999; FENWICK *et al.*, 2008).

A insulina é um potente hormônio anabólico em diferentes tipos celulares (SALTIEL e KAHN, 2001), estimulando o transporte de glicose (SUMMERS *et al.*, 1999), aminoácidos e RNA, promovendo a síntese protéica e de glicogênio (MCGOWAN *et al.*, 1995), além de ter propriedades mitogénicas e anti-apoptóticas (ALESSI e COHEN, 1998; DOWNWARD, 1998; DALLE *et al.*, 2001).

Tendo em vista as diversas vantagens e aplicações do IGF-1 e Insulina na PIV de embriões, especialmente na fecundação *in vitro*, a nossa hipótese é que a adição de IGF-1 ou Insulina na criopreservação de sêmen promoverá aumento na taxa de clivagem e produção *in vitro* de embrião. Desta forma, este experimento teve como objetivo avaliar o efeito da adição IGF-1 e insulina ao sêmen criopreservado na produção *in vitro* de embriões bovinos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Obtenção de Complexos Cumulus Oócitos (CCOs)

O desenvolvimento dos folículos ovarianos começa durante a vida fetal com a transformação de células germinativas primordiais em oócitos (MCGEE e HSUEH, 2000; HIRSHFIELD, 1991). Para a maioria dos mamíferos, os CCOs encontram-se em prófase I, e somente após a puberdade ocorre a retomada da meiose até atingirem a metáfase II, expulsando o 1º corpúsculo polar, por ação de hormônios gonadotróficos como LH e FSH (HAFEZ e HAFEZ, 2004; GONÇALVES *et al.*, 2001).

Há diversas técnicas para obtenção dos CCOs e este possui considerável impacto sobre a quantidade e qualidade morfológica dos complexos *cumulus* oócitos (CCOs), e conseqüentemente sobre a competência para o desenvolvimento embrionário (BOLS *et al.*, 1997).

Assim a taxa de recuperação pode ser influenciada pelas terapias gonadotróficas (PIETERSE *et al.*, 1992), frequência de realização da técnica (GIBBONS *et al.*, 1994), fase do ciclo (VOS *et al.*, 1994), pressão de vácuo e tipo de agulha (BOLS *et al.*, 1996), tamanho do folículo (SENEDA *et al.*, 2001), além da experiência do operador (GARCIA *et al.*, 1998).

No entanto a PIV de embriões a partir de ovários de matadouro possui limitações, como o tempo de transporte do matadouro ao laboratório, o desconhecimento acerca do estado de saúde, do padrão hormonal dos animais e, principalmente, a impossibilidade de repetição da técnica para um mesmo animal.

Callesen *et al.*, (1987) relataram pela primeira vez a obtenção de CCOs bovinos através da manipulação transretal com uso da ultrassonografia, porem só ganhou grande impulso um ano mais tarde, com uma nova modificação que tornou o procedimento mais fácil e de rápida aplicação. Pieterse *et al.*, (1988) modificaram a técnica descrita para humanos (FEICHTINGER e KEMETER, 1986) e descreveram a aspiração folicular via transvaginal através da ultrassonografia.

## 2.2. Maturação *in vitro* (MIV)

A Maturação *in vitro* (MIV) é influenciada pela origem e qualidade dos CCOs, principalmente pela heterogeneidade oocitária em decorrência dos diferentes estágios do ciclo estral e da foliculogênese (PARAMIO, 2010), pelas condições de incubação e pela composição dos meios utilizados (COCERO *et al.*, 2011).

Técnicas de MIV têm sido desenvolvidas para o aproveitamento de CCOs, com o objetivo de produzir embriões em larga escala. Apesar dos avanços alcançados pela técnica, os embriões produzidos *in vitro* ainda apresentam diferenças morfológicas e metabólicas daqueles produzidos *in vivo*, geralmente provocados pelas condições de cultivo (HOLM e CALLESEN, 1998). Essas alterações têm tornado os embriões produzidos *in vitro* mais sensíveis ao resfriamento e à congelação (MASSIP, 2001), diminuindo a viabilidade pós-descongelação e a taxa de gestação (HOLM e CALLESEN, 1998), mantendo baixa a eficiência da técnica (MARQUANT-LEGUIENN e HUMBLLOT, 1998). As diferenças podem ser atribuídas à menor competência dos CCOs aspirados dos folículos, e às falhas nos processos de maturação e fecundação, ou no cultivo do embrião.

Enquanto está dentro de um folículo não ovulatório, o reinício da meiose dos CCOs é inibido por fatores presentes no ambiente folicular (SIRARD *et al.*, 1998). Entretanto, logo após a aspiração, os CCOs perde contato com o fluido folicular e reinicia a meiose espontaneamente, tornando importante o tempo entre a aspiração e o início da maturação *in vitro*, a fim de não comprometer a capacidade de fertilização dos CCOs e de desenvolvimento do embrião (DOMINKO e FIRST, 1997). Portanto, é necessário que os CCOs seja colocado o quanto antes em ambiente e meio de cultivo adequado para a maturação *in vitro*, ou então que a sua maturação seja inibida por meio de condições induzidas, até que se dê início ao cultivo para a maturação.

O tempo requerido para maturação *in vitro* pode variar entre as diferentes espécies (MINGOTI, 2005), sendo de 18-24 horas para bovinos (MERTON *et al.*, 2003), 28-36 horas para equinos (CARNEIRO, 2002), 30 horas para caprinos (SHARMA *et al.*, 1996) e de 48 horas para suínos (SOMFAI *et al.*, 2005).

Sabe-se que os CCOs tem competência para completar a maturação meiótica ao atingir diâmetro aproximado de 110  $\mu\text{m}$ . Muitos dos CCOs bovinos aspirados são provenientes de folículos terciários, com diâmetro entre 80 e 110  $\mu\text{m}$  (HYTTEL *et al.*, 1997), de menor competência, sendo necessário um período de pré-maturação para



alcançá-la, a fim de proporcionar maturação citoplasmática mais completa (HENDRIKSEN *et al.*, 2000).

A maturação dos CCOs está ligada a uma série de mudanças estruturais e bioquímicas que tornam o gameta feminino apto para ser fecundado, ocorrendo reorganização citoplasmática, com aumento das gotículas de lipídios, alterações no complexo de Golgi e no formato das mitocôndrias, migração centrípeta dos grânulos corticais para evitar a polispermia no momento da fecundação (HYTTEL *et al.*, 1997; MERTON *et al.*, 2003). Durante todo o seu desenvolvimento, os CCOs encontram-se no estágio de diplóteno da prófase I ou estágio de vesícula germinativa (VG). *In vivo*, o reinício da meiose ou maturação tem início após o pico préovulatório de LH durante o estro, passando do estágio diplóteno da primeira prófase meiótica até a fase de metáfase II (MII) (GONÇALVES *et al.*, 2002).

Para a maturação *in vitro* dos CCOs bovino é utilizado em geral o meio base para cultivo de tecido (TCM 199) com sais de EARLE'S (AYOUB e HUNTER, 1993), podendo ser modificado de acordo com os protocolos de cada laboratório, suplementando-os com fonte energética, glicose e piruvato; fonte protéica, soro fetal bovino e BSA ou macromoléculas sintéticas, álcool polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP) – (ALI e SIRARD, 2003) bicarbonato de sódio, L-glutamina, HEPES e hormônios LH, FSH (GONÇALVES *et al.*, 2001) e estradiol. Além da composição do meio, outros fatores como o pH, a osmolaridade, a composição iônica, a temperatura da estufa (38,5° / 39°C) e a tensão de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> (NAGAI, 2001) são importantes para que a maturação ocorra com sucesso.

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

A fertilização *in vitro* (FIV) é uma técnica que tem sido utilizada para estudar a fisiologia dos processos de maturação oocitária, fecundação e desenvolvimento embrionário no estágio de pré-implantação, bem como propiciar o desenvolvimento de outras técnicas, como clonagem e transferência de genes. Utilizada para produzir indivíduos com elevado mérito genéticos, a FIV constitui-se como fonte alternativa de embriões em programas de transferência de embriões em várias espécies (STROUD e MYERS, 1993; HASLER, 1996; HANZEN e GOFFIN, 1998). Contudo, existe grande variação com relação à taxa de clivagem e produção de mórulas e blastocistos oriundos

do sistema de FIV (LOONEY *et al.*, 1994; ELMILEIK *et al.*, 1995; JAAKMA *et al.*, 1997; FARIN *et al.*, 1997; CHOI *et al.*, 1998). Essas diferenças são determinadas por vários fatores decorrentes das etapas que constituem esse sistema, entre eles o preparo do sêmen e a indução da capacitação espermática. A capacitação *in vitro* requer a seleção e recuperação de espermatozoides móveis, formas normais, livres de contaminantes do plasma seminal.

Têm sido utilizados diversos métodos de separação do plasma seminal e separação da fração móvel do sêmen diluído e descongelado, como a técnica do sedimento – swimup (PARRISH *et al.*, 1984), separação por gradiente descontínuo de BSA (ESTIENNE *et al.*, 1988), filtração em coluna de lã de vidro, técnica do sedimento – swimdown (ING *et al.*, 1991), filtração em coluna de sefadex/filtro de troca iônica (ANZAR e GRAHAM, 1993), separação por gradiente descontínuo de Percoll e lavagem mediante centrifugação (JAAKMA *et al.*, 1997).

Esses métodos, além de melhorar a viabilidade pós-descongelção do sêmen utilizado para FIV, também separam o diluidor do sêmen. Entretanto, pode-se observar que, mesmo utilizando alguns desses métodos, a viabilidade pós-descongelção ainda é significativamente afetada pelo diluidor do sêmen (ANZAR e GRAHAM, 1995), podendo interferir nos subseqüentes processos de fecundação e/ou desenvolvimento embrionário.

A etapa de fecundação consiste no momento em que o espermatozoide fecunda o oócito maturo, promovendo elevações transitórias de cálcio livre intracelular, o que resulta na retomada da meiose e, posteriormente, na formação dos pro-núcleos (KUPKER *et al.*, 1998). A fecundação é um processo complexo que resulta na união de dois gametas, promovendo a restauração do número de cromossomos para o começo do desenvolvimento de um novo indivíduo (GORDON, 1994).

Os eventos iniciais da ativação ocorrem a nível nuclear, com a retomada da meiose, transição de anáfase para telófase II e extrusão do segundo corpúsculo polar (CP). No citoplasma, ocorre a exocitose dos grânulos corticais (GC), e conseqüente endurecimento da zona pelúcida (ZP), promovendo o bloqueio à polispermia (LIU *et al.*, 2003).

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

Apesar dos avanços nas técnicas de CIV nos últimos anos, esta etapa ainda é considerada limitante em virtude dos baixos índices em relação ao cultivo *in vivo* (BERNARDI, 2005), principalmente pelo bloqueio no desenvolvimento embrionário, quando os embriões encontram-se entre duas e dezesseis células dependendo da espécie, atribuindo-se a resposta embrionária aos efeitos adversos ou carências do sistema de cultivo no momento da transição do genoma materno para o embrionário (BARNES e EYSTONE, 1990; PETTERS, 1992).

Embriões produzidos *in vitro* têm geralmente citoplasma mais escuro, a falta de compactação da massa celular, formação prematura do blastocelo, alteração no raio entre a massa celular interna e células trofoblásticas, maior mixoploidia, e alterações na expressão do gene e metabolismo celular (THAMPSON *et al.*, 1990; LECHNIAK *et al.*, 1998; KHURANA e NIEMANN, 2000 e LONERGAN *et al.*, 2006).

Contudo os primeiros resultados com o cultivo *in vitro* de embriões até o estágio de blastocisto ocorreram em 1959, em coelhos (GORDON, 1994). Durante o desenvolvimento embrionário, ocorrem sucessivas clivagens, ativação do genoma e eventos morfogênicos de compactação e cavitação, culminando com a formação do blastocisto (WATSON *et al.*, 2004).

No final da década de 80, iniciou-se o co-cultivo de embriões com células somáticas (GANDOLFI e MOOR, 1987). As mais utilizadas são as células do oviduto, células da granulosa, VERO (células renais de macaco verde africano), BRL (células de fígado de rato búfalo), entre outras (GORDON, 1994; GONSALVES *et al.*, 2002). O principal benefício da adição das células somáticas está na produção de fatores de crescimento e na remoção de componentes deletérios aos embriões, como: radicais livres, metabólitos celulares, amônia e outros (THOMPSON, 1996; GONSALVES *et al.*, 2002).

Diversos meios de cultivo têm sido utilizados no CIV como: Hamster Embryo Culture Medium (HECM) e TCM-199 (Tissue Culture Medium). Porém o meio de CIV mais comumente utilizado é o SOF (Synthetic Oviductal Fluid), suplementado com aminoácidos, BSA (Albumina Sérica Bovina) e/ou SFB (Soro Fetal Bovino), (BERNARDI, 2005).

## 2.5. Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo1 (IGF-1)

Os fatores de crescimento desempenham papéis importantes na capacidade de desenvolvimento dos CCOs e embriões de várias espécies. Vários fatores de crescimento e os seus ligantes estão presentes no desenvolvimento de embriões de mamíferos, tais como, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento semelhante à insulina tipo1 e 2 (IGF-1 e 2), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e a família do fator de necrose tumoral (TNF) (HARDY e SPANOS, 2002).

IGF-1 e IGF-2 foram inicialmente identificados por Salmon e Daughaday em 1957, que o designou de fator de sulfatação, devido à sua capacidade de incorporar sulfato em cartilagem de rato *in vitro*. Uma década mais tarde, os termos fator de sulfatação foram substituídas somatomedina (DAUGHADAY *et al.*, 1972). Devido à sua semelhança estrutural com a insulina e as suas atividades de promoção do crescimento foram renomeados em IGF 1 e 2 (RINDERKNECHT e HUMBEL 1976a, 1976b).

O Fator de crescimento semelhante à insulina - 1 (IGF-1) é um peptídeo pequeno de 70 aminoácidos com uma massa molecular de 7649 daltons (LARON Z, 2001) que regula a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (BENITO *et al.*, 1996; VINCENT *et al.*, 2002), promove a maturação dos CCOs por desencadear a divisão mitótica das células da granulosa (SHABANKAREH e ZANDI, 2010), estimulando o crescimento dos blastocistos, aumentando a absorção da glicose (CARAYANNOPOULOS *et al.*, 2000) e prevenindo a apoptose (NEIRA *et al.*, 2010; PARIA e DEY, 1990; SHABANKAREH e ZANDI, 2010). É Produzido em vários órgãos reprodutivos como hipotálamo, ovários, tubas uterinas e útero (SPICER e ECHTERNKAMP, 1995; WATSON *et al.*, 1999; DAFTARY e GORE, 2005). No entanto, a maior parte do IGF-1 circulante é produzida pelo fígado (PFAFFLM *et al.*, 1998;YAKAR, *et al.*, 1999; FENWICK *et al.*, 2008).

Os principais efeitos *in vitro* do IGF-1 em fêmeas bovinas incluem: aumento da proliferação de células da granulosa e produção de estradiol (GLISTER *et al.*, 2001; GONG *et al.*, 1994), aumento da sensibilidade das células da granulosa ao FSH (SPICER *et al.*, 2002), aumento da secreção de inibina, activina A e folistatina pelas células da granulosa (GLISTER *et al.*, 2001), e melhorar a síntese de androgénio induzida por LH nas células da teca (STEWART *et al.*, 1995). O IGF-1 endócrino tem sido associado com várias características reprodutivas, tais como: a idade à primeira

parição (YILMAZ *et al.*, 2006; BRICKELL *et al.*, 2007), a taxa de concepção ao primeiro serviço (PATTON *et al.*, 2007), dupla ovulações (ECHTERNKAMP *et al.*, 2004), e no desenvolvimento pré-implantação do embrião (VELAZQUEZ *et al.*, 2005).

## 2.6. Insulina

A insulina é uma potente hormônio anabólico em diferentes tipos celulares (SALTIEL e KAHN, 2001), estimulando o transporte de glicose (SUMMERS *et al.*, 1999), aminoácidos e RNA, promovendo a síntese protéica e de glicogênio (MCGOWAN *et al.*, 1995), além de ter propriedades mitogénicas e anti-apoptóticas (ALESSI e COHEN, 1998; DOWNWARD, 1998; DALLE *et al.*, 2001).

Amsterdam *et al.* (1988) verificaram que a insulina e o FSH atuam de maneira sinérgica no cultivo *in vitro* de células da granulosa de suínos, por promoverem aumento de formação de junções gap, maior desenvolvimento do retículo endoplasmático liso, mitocôndrias e complexo de Golgi. Em bovinos, a insulina na presença do FSH é capaz de estimular a proliferação e esteroidogênese de células da granulosa de maneira dose dependente (GUTIÉRREZ *et al.*, 1997).

A insulina aumenta a captação de glicose nas células por estimular a translocação do transportador de glicose (GLUT8) a partir de sítos intracelular para a superfície da célula. Acredita-se geralmente que a glicose não é necessária para a sobrevivência de embriões no início da pré-implantação em varias espécies, incluindo o homem (BAVISTER, 1995; GARDNER e LANE, 1997). O embrião jovem, na fase de clivagem é caracterizado por níveis relativamente baixos de biossíntese (EPSTEIN e SMITH, 1973), baixas taxas respiratórias (MILLS e BRINSTER, 1967; HOUGHTON *et al.*, 1996; THOMPSON *et al.*, 1996) e limitada capacidade de utilizar a glicose como fonte de energia (BRINSTER e THOMSON, 1966; BIGGERS *et al.*, 1967; WHITTINGHAM, 1971; LEESE e BARTON, 1984; GARDNER e LEESE, 1986; LEESE, 1991). Em meios de cultura simples, a glicose é responsável pelo atraso ou parada no desenvolvimento dos embriões na fase de clivagem de várias espécies de mamíferos (SCHINI e BAVISTER, 1988, CHATOT *et al.*, 1989; THOMPSON *et al.*, 1992; CONAGHAN *et al.*, 1993; GARDNER e LANE, 1993; ROSENKRANS *et al.*, 1993; MATSUYAMA *et al.*, 1993; QUINN, 1995).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

Avaliar o efeito adição de Insulina e/ou Fator de crescimento semelhante à insulina tipo-1 (IGF-1) ao diluidor do sêmen na produção *in vitro* de embriões bovinos.

#### **3.2. Específicos**

- Avaliar a qualidade dos CCOs;
- Quantificar as taxas de clivagens (D2) e de blastocistos (D7);
- Quantificar e qualificar os embriões produzidos;
- Avaliar as taxas das estruturas degeneradas e não fertilizados.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Local do Experimento e Coleta dos Ovários

O experimento foi conduzido no Laboratório de Reprodução Animal (LABRA) do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA). Foram coletados ovários de fêmeas bovinas proveniente do abatedouro DA Vital (2°39'31.0"S; 44°17'16.2"W). Os ovários foram condicionados em garrafa térmica com solução salina 0,9% a 38 °C e transportados até o laboratório em período máximo de até 3 horas após o abate.

### 4.2. Grupos Experimentais

Foram separados três tratamentos experimentais: Controle (palhetas de sêmen convencional), Insulina (adição de 100 µUI/mL de insulina NPH-humana), IGF-1 (adição de 150ng/mL de Fator de Crescimento Semelhante a Insulina tipo 1) e Insulina + IGF-1 (adição de 50 µUI/mL de insulina NPH-humana e 75 ng/mL de IGF-1), conforme o quadro 1. Todas as seis repetições receberam todos os tratamentos no momento da fecundação *in vitro*, no período de abril a dezembro 2014. Foi utilizado o sêmen de um único touro da raça Nelore, com aproximadamente 500 kg, avaliado andrologicamente e utilizou-se o diluidor TRIS a base de gema de ovo.

**Quadro 1.** Grupos experimentais (Controle, Insulina, IGF-1 e Insulina+IGF-1), quantidade por mililitro e volume da palheta ajustada para  $25 \times 10^6$  espermatozoides vivos/mL.

TRATAMENTOS	QUANTIDADE / mL	Volume da Palheta (mL)
CONTROLE	Sêmen Convencional (Central)	0,5*
INSULINA	Adição de 100 µUI/mL de insulina NPH-humana	0,25*
IGF-1	Adição de 150ng/mL de IGF-1	0,25*
INSULINA+IGF-1	Adição de 50 µUI/mL de insulina NPH-humana e 75 ng/mL de IGF-1	0,25*

\*Concentração espermática ajustada para  $25 \times 10^6$  espermatozoides vivos/mL.

### **4.3. Produção *in vitro* de embrião**

#### **4.3.1 Punção Folicular e Seleção dos Complexos Cumulus Oócitos**

Os CCOs foram colhidos por aspiração folicular utilizando seringa descartável de 10 mL (Niproplast®) com uma agulha descartável (Labor Import®) 21 G 25 x 0,8 e somente aspirados os folículos de 3 a 8 mm. Após a colheita, o líquido folicular foi depositado em tubo cônico graduado de 15 mL (Corning®) para sedimentação e acondicionado a 37 °C no banho-maria (Modelo Fanem 1102®). Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o restante colocado em placa de Petri TPP 96 x 21 (Vitaflex®) para busca e seleção dos CCOs sob lupa estereomicroscópica (Modelo LBX-20 Nona Optical System®) e placa térmica (Modelo Nova HS®) a 38,5 °C. Os CCOs encontrados foram colocados em placas de Petri 35x10 (Vitaflex®) contendo Meio de Manutenção (TQC-Holding Plus Nutricell®) previamente aquecido a 37 °C e selecionados somente os CCOs grau I, II e III, conforme manual IETS, segundo (LEIBFRIED e FIRST, 1979).

#### **4.3.2 Maturação *in vitro* (MIV)**

Após a seleção dos CCOs os mesmos foram lavados três vezes em gotas contendo meio de maturação com 10% de SFB, sendo em seguida transferidos para micro gotas contendo 100 µL de meio MIV (LABRAUEMA) em placas de Petri de 60 x 15 mm, numeradas e contendo sete gotas de MIV cobertas com óleo mineral estéril (SIGMAALDRICH, EUA), à temperatura de 38,8 °C, em atmosfera gasosa de 5% de CO<sub>2</sub> (Incubadora, Modelo Panasonic KM-CC17T0A®), previamente estabilizadas.

#### **4.3.3 Fertilização *in vitro* (FIV)**

Após 24 horas de incubação os CCOs maturados foram lavados três vezes em 940 µL de meio de fecundação (LABRAUEMA) suplementado com 20 µL de heparina e 40 µL de solução PHE (LABRAUEMA). Uma palheta de sêmen de cada tratamento (Controle, Insulina, IGF-1 e Insulina + IGF-1) foi descongelada a 37 °C durante 30 segundos, avaliadas a motilidade e vigor, em seguida colocada em gradiente de Percoll (LABRAUEMA) sendo em seguida depositado em um tubo criogênico de 2 mL



(eppendorf®), sobre um gradiente de Percoll de 90 e 45% (LABRAUEMA). O sêmen foi depositado sobre a camada superior de Percoll® a 45%, em seguida foi centrifugado por 10 minutos a 2290 x g (Modelo K14-0602 Kasvi®). Após centrifugação desprezou-se o sobrenadante e adicionou 940 µL do meio de Fecundação (LABRAUEMA) suplementados com 20 µL/mL de heparina (SIGMA-ALDRICH, EUA), 40 µL/mL de PHE (SIGMA-ALDRICH, EUA), previamente estabilizados e aquecidos a 38,7 °C ao pellet resultante. Centrifugou-se novamente por 5 minutos a 2290 x g (Modelo K14-0602 Kasvi®) e desprezou-se o sobrenadante, homogeneizando o pellet final para retirada da dose inseminante de cada gota da placa de fecundação. Posteriormente os CCOs foram transferidos para gotas contendo Meio de Fecundação (LABRAUEMA) sob óleo mineral estéril (SIGMA-ALDRICH, EUA), onde foi depositada a suspensão espermática na concentração final de  $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Os gametas foram co-incubados durante o período de 18 a 22 horas a 38,8 °C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.3.4 Cultivo *in vitro* (CIV)**

Após 18 horas de incubação, os presumíveis zigotos foram transferidos para placa de cultivo com gotas de 100 µL do meio SOF Final (LABRAUEMA) acrescido de 5% de SFB e 3mg/mL de BSA (Albumina Sérica Bovina), sob óleo mineral estéril e incubados a 38,8 °C em atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub> durante sete dias de cultivo. Decorridas 48 horas após a fecundação (D0), foi avaliado a taxa de clivagem (D2), e sete dias após a taxa de desenvolvimento dos blastocistos (D7). Nos dias (D3 e D5) foi realizado o “feeding” ou troca de meio, retirando-se 80% do meio de cultivo e adicionando a mesma quantidade de meio recém-preparado e estabilizado.

#### **4.4. Delineamento Experimental e Análise Estatística**

O delineamento utilizado foi inteiramente ao acaso, com três tratamentos (Insulina, IGF-1, Insulina + IGF-1 e Controle) com seis repetições. Os dados para as variáveis estudadas (taxa de clivagem; taxa de blastocisto; total e proporção de embriões viáveis, proporção dos estádios de desenvolvimento, qualidade embrionária, estruturas degeneradas e não fertilizados) foram submetidas ao teste de normalidade; os dados normais e os normalizados mediante transformações matemáticas (logarítmica, arco seno) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ou ao teste paramétrico de Student-Newman-Keuls (SNK) para comparação de médias, na probabilidade de 5%. Dados qualitativos foram comparados pelo teste do  $\chi^2$ , para  $P < 0,05$ . As análises foram executadas utilizando o programa Statistical Analysis System (SAS InstituteInc, 1997).

## 5. RESULTADOS

Foram aspirados durante o experimento 679 ovários, recuperados 671 oócitos grau I, 329 grau II e 152 grau III, distribuídos em seis repetições para cada tratamento.

Não houve diferença estatisticamente ( $P>0,05$ ) para as Taxas de Clivagens e de Blastocistos conforme tabela 1.

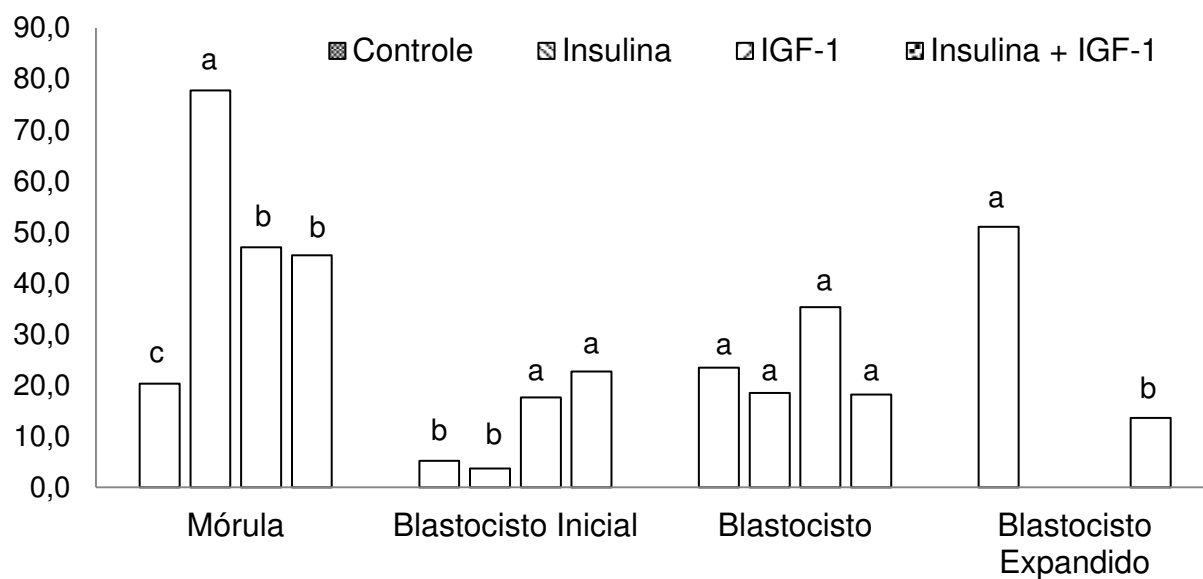
**Tabela 1.** Taxa de Clivagem e de Blastocistos de complexos *cumulus* oócitos (CCOs) de fêmeas bovinas submetidas à fecundação *in vitro* com adição de Insulina e/ou IGF-1 ao diluidor do sêmen

	TRATAMENTOS											
	Controle			Insulina			IGF-1			Insulina + IGF-1		
	CLIV	n	% <sup>†</sup>	CLIV	n	% <sup>†</sup>	CLIV	N	% <sup>†</sup>	CLIV	n	% <sup>†</sup>
<b>Taxa de Clivagem</b>	402	729	55,1 <sup>a</sup>	82	144	56,9 <sup>a</sup>	69	115	60,0 <sup>a</sup>	74	128	57,8 <sup>a</sup>
<b>Taxa de Blastocistos</b>	192	45	23,4 <sup>a</sup>	27	5	18,5 <sup>a</sup>	17	6	35,3 <sup>a</sup>	22	4	18,2 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>: Números seguidos de letras desiguais na linha diferem estatisticamente, para  $P<0,05$ .

<sup>†</sup>Taxa de desenvolvimento no D2 e D7 baseada no número total de estruturas colocadas em CIV.

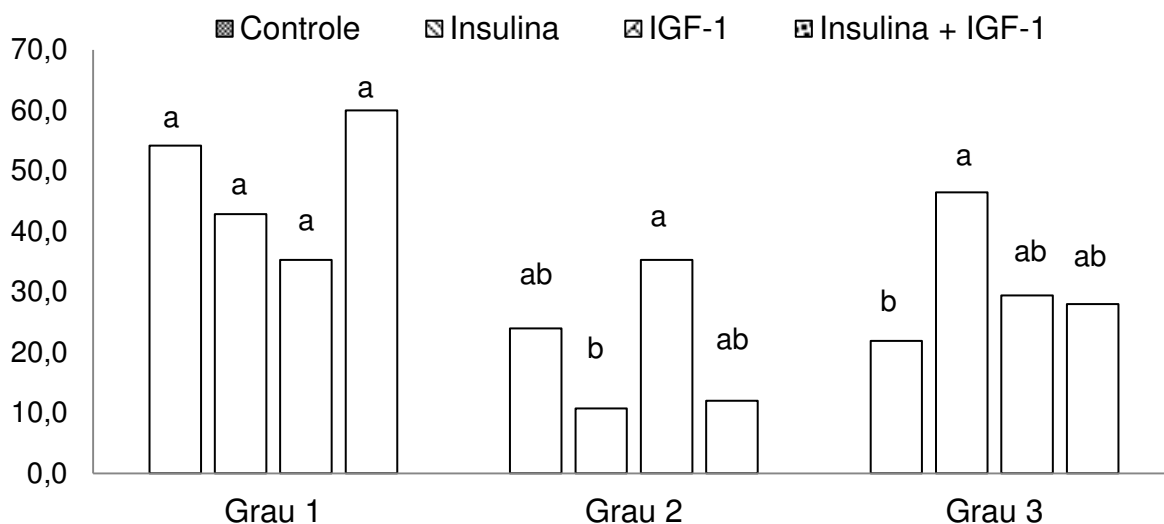
Com base no estágio de desenvolvimento para embriões bovinos produzidos *in vitro* observou-se que o tratamento com Insulina resultou em maiores produções de mórulas (77,8%). Os tratamentos com IGF-1 (17,6%) e Insulina + IGF-1 (22,7%), apresentaram maiores taxas para o estágio de Blastocisto Inicial em relação aos tratamentos Controle (5,2%) e Insulina (3,7%). Para o estágio de Blastocisto não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos. A Utilização do tratamento Controle resultou em maiores taxas de Blastocisto Expandido (51,0%), conforme Figura 1.



**Figura 1.** Taxa de desenvolvimento embrionário (%), com base no estágio de desenvolvimento, para embriões produzidos *in vitro* a partir de sêmen criopreservados com adição de Insulina e/ou IGF-1 ao diluidor do sêmen

<sup>ab</sup>: Colunas com superscritos desiguais diferem estatisticamente,  $P < 0,05$ .

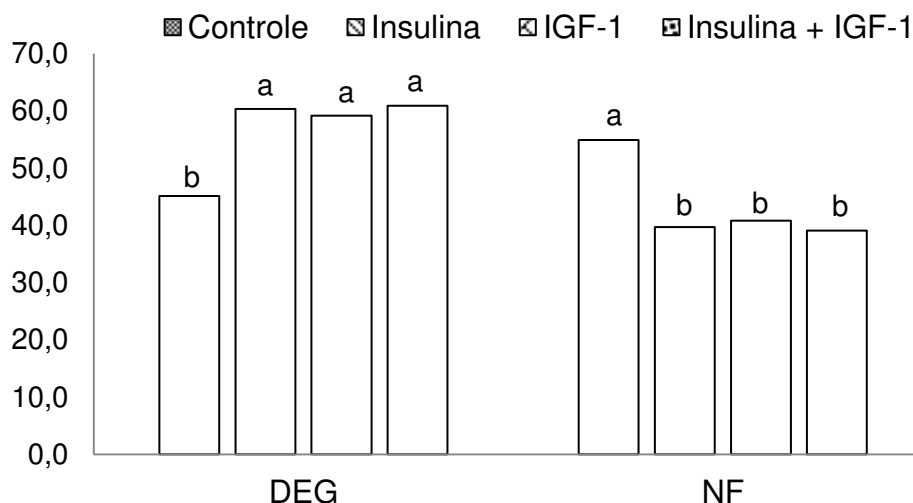
Ao analisar a qualidade morfológica para embriões produzidos *in vitro* observou-se que não houve diferença significativa para qualidade grau I ( $P > 0,05$ ). Para a qualidade grau II o tratamento com IGF-1 (35,3%) apresentou as maiores taxas, seguidos por Controle (24,0%), Insulina + IGF-1 (12,0%) e Insulina (10,7%). Porém para a qualidade grau III o tratamento com Insulina (46,4%), foi o que apresentou maiores taxas, seguidos por IGF-1 (29,4%), Insulina + IGF-1 (28,0%) e Controle (21,9%), respectivamente conforme Figura 2.



**Figura 2.** Taxa de desenvolvimento embrionário (%), com base na qualidade morfológica para embriões produzidos *in vitro* a partir de sêmen criopreservados com adição de Insulina e/ou IGF-1 ao diluidor do sêmen

<sup>ab</sup>: Colunas com superscritos (?) desiguais diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).

Ao analisar as taxas de Estruturas Degeneradas (DEG), verificou-se que os tratamentos Insulina + IGF-1 (60,9%), Insulina (60,3%) e IGF-1 (59,2%), foram os com maiores taxas, porem não diferem estatisticamente ( $P > 0,05$ ). Contudo o tratamento Controle (54,9%) apresentou maior taxa de Não Fertilizado (NF), conforme Figura 3.



**Figura 3.** Taxa de Estruturas Degeneradas (DEG) e não fertilizadas (NF) (%), a partir de sêmen criopreservados com adição de Insulina e/ou IGF-1 ao diluidor do sêmen

<sup>ab</sup>: Colunas com superscritos desiguais diferem estatisticamente,  $P < 0,05$ .

## 6. DISCUSSÃO

Segundo Gonçalves *et al.* 2008, a produção *in vitro* de embriões bovinos possui baixas taxas de desenvolvimento embrionárias quando comparada com a situação *in vivo*. Diversos estudos vêm sendo realizados para melhoria nessas taxas e conseqüentemente sua aplicação comercial.

Neste estudo ao analisar as taxas de clivagens e de blastocisto para embriões bovinos produzidos *in vitro*, observou-se que não houve efeito benéfico para os tratamentos que foram fertilizados com adição de Insulina e/ou IGF-1. Diversos autores têm demonstrado que a suplementação nos meios de cultivo com IGF-1 nas concentrações variando de 10 a 200 ng/mL tem um efeito positivo na PIV de embriões bovinos (MATSUI *et al.*, 1997; PALMA *et al.*, 1997; LIMA *et al.*, 2006; VELAZQUEZ *et al.*, 2008). Contudo, corroborando com nossos resultados, alguns autores não encontraram efeitos benéficos da adição de IGF-1 (FLOOD *et al.*, 1993; LEE e FUKUI, 1995; QUETGLAS *et al.*, 2001; HERNANDEZ-FONSECA *et al.*, 2002; BLOCK *et al.*, 2008), podendo ser atribuído aos diferentes meios de cultivo utilizados (DEVREKER e HARDY, 1997), as concentrações de IGF-1, a população heterogênea de oócitos aspirados a partir dos folículos de 3 a 8 mm ou a suplementação protéica (VELAZQUEZ *et al.*, 2009).

Muitos laboratórios têm conseguido produzir embriões *in vitro* eficientemente (BOUSQUET *et al.*, 1999). No entanto, o número de embriões que se desenvolve está longe do que é normalmente observado em embriões produzidos *in vivo*. Em média, um laboratório perde de 60 a 70% dos oócitos maturados *in vitro*, devido à incapacidade inerente do embrião de clivar e desenvolver-se até o estágio de blastocisto (LEQUARRE *et al.*, 2003). Fatores como o bloqueio embrionário, podem interferir no desenvolvimento causando parada na clivagem embrionária. O bloqueio no desenvolvimento do embrião é um fenômeno que ocorre em várias espécies em diferentes fases, por exemplo, no quarto ciclo celular em bovinos (MEMILI e FIRIST, 2000), ocorre devido à incapacidade do embrião de superar a repressão da cromatina a ativar a transcrição de genes de desenvolvimento ou a reação a injúrias causada pelo meio ambiente (BETTS e KING, 2001). Este bloqueio específico em cada espécie é concomitante com a transição materno-embrião, quando o embrião conclui a maior ativação do genoma (DE SOUSA *et al.*, 1998b) e devem contar com os mRNAs transcritos a partir de seu próprio genoma para continuar o desenvolvimento.

Porem sabe-se que insulina aumenta a captação de glicose nas células por estimular a translocação do transportador de glicose (GLUT8) a partir de sítios intracelular para a superfície da célula. Acredita-se geralmente que a glicose não é necessária para a sobrevivência dos embriões no início da pré-implantação (BAVISTER, 1995; GARDNER e LANE, 1997) bem como é responsável pelo atraso ou parada no desenvolvimento dos embriões na fase de clivagem em varias espécies (THOMPSON *et al.*, 1992; MATSUYAMA *et al.*, 1993; GARDNER e LANE, 1993b), devido principalmente pela capacidade limitada dos embriões em utilizar a glicose como fonte de energia (BIGGERS *et al.*, 1967; GARDNER e LEESE, 1986).

Com base no estágio de desenvolvimento para embriões bovinos produzidos *in vitro* observou-se que o tratamento com Insulina resultou em maiores produções de Mórulas. Segundo Gonçalves *et al.* (2008), somente a partir do estágio de mórula, os embriões bovinos podem utilizar a glicose como fonte de energia, possivelmente em decorrência do sistema enzimático necessário para sua utilização não estar completamente desenvolvido.

Para o estágio de Blastocisto Inicial os tratamentos com IGF-1 e Insulina + IGF-1 apresentaram maiores taxas. Segundo Memili e Firist (2000) o bloqueio no desenvolvimento do embrião bovino ocorre no quarto ciclo celular, ou seja, no momento da passagem do estágio de mórula para o estágio de blastocisto inicial. Portanto os tratamentos com IGF-1 e Insulina + IGF-1 podem ter melhorado a qualidade nesses embriões com desenvolvimento atrasados, a ponto dos mesmos superarem o bloqueio embrionário inerente o quanto antes e alcançarem o estágio de blastocisto inicial. Vários relatórios têm destacado que embriões que se desenvolvem *in vitro* mais rápido são mais propensos a desenvolver a blastocisto (LONERGAN *et al.*, 1992; VAN SOOM *et al.*, 1992; XU *et al.*, 1992;).

Nesse estudo o tratamento Controle apresentou maiores taxas de blastocistos expandidos. Vários laboratórios tem conseguido produzir embriões bovinos utilizando meio de cultivo composto por SOF acrescido de BSA e SFB. Assim a não adição de Insulina e/ou IGF-1 ao tratamento Controle pode ter eliminado os efeitos adversos dessas substancias na produção *in vitro*. Pois a simples utilização do SFB pode ter favorecido o desenvolvimento dos embriões até o estágio de blastocisto expandido, uma vez que o SFB é um suplemento proteico composto por diversas substâncias, como proteínas, carboidratos, aminoácidos, hormônios e fatores de crescimento, que podem agir de forma autócrina ou parácrina para regular a proliferação celular e a sobrevivência

dos embriões (BRISON e SCHULTZ, 1997, HERRLER *et al.*, 1998; SPANOS *et al.*, 2000).

Ao analisar a qualidade morfológica para embriões produzidos *in vitro*, observou-se que não houve diferença significativa para embriões de qualidade grau I, o tratamento com IGF-1 apresentou maiores percentuais para a qualidade grau II, porém o tratamento com Insulina, resultou em maiores taxas para a qualidade grau III. A classificação da qualidade dos embriões é uma etapa muito importante para o sucesso em um programa de PIV, pois essa classificação pode prever o potencial desenvolvimento dos embriões. Embriões de excelente ou boa qualidade caracterizam-se por estágio de desenvolvimento correspondente ao esperado para o dia do cultivo. Segundo Neira *et al.*, (2010) e Shabankareh e Zandi, (2010), o IGF-1 possui potencial anti-apoptótico, o que pode ter melhorado a qualidade dos embriões. Porém ao utilizarmos o tratamento com Insulina obtivemos embriões de pior qualidade, pois geralmente permaneciam no estágio de mórulas e conseqüentemente degeneravam. Segundo Gardner e Lane, (1997), a insulina aumenta a captação de glicose que é responsável pelo atraso ou parada no desenvolvimento dos embriões (THOMPSON *et al.*, 1992; MATSUYAMA *et al.*, 1993; GARDNER e LANE, 1993).

Os tratamentos com Insulina e/ou IGF1 apresentaram maiores percentuais de estruturas degeneradas e menores taxas de embriões não fertilizados. Embriões degenerados são caracterizados por apresentarem comprometimento definitivo da massa celular, blastômeros de tamanhos variados, sinais de degeneração celular, picnose, fragmentações e alterações na cor. Segundo Hardy (1999), o processo de morte celular controlada (apoptose) ocorre como um fenômeno fisiológico no desenvolvimento embrionário precoce, suas funções incluem a homeostase e remodelação dos tecidos, e a remoção de células indesejáveis. É uma característica essencial de muitos processos normais e condições patológicas (WYLLIE *et al.*, 1980). No entanto, diferentes condições de cultivo *in vitro* pode afetar a taxa de apoptose em embriões pré-implantação (BYRNE *et al.*, 1999). Assim a utilização dos tratamentos com Insulina e/ou IGF-1 apesar de favorecer a fertilização dos embriões, não propiciou o desenvolvimento até estágios de blastocistos, visto que esses embriões tendem a degenerar e sofrer apoptose, principalmente pelo bloqueio embrionário e pelas condições de cultivo.



## 7. CONCLUSÃO

Diante dos dados obtidos podemos concluir que adição de Insulina e/ou IGF-1 ao diluidor do sêmen não aumentou as taxas de clivagens e de blastocistos dos embriões produzidos *in vitro*, não melhorando a qualidade embrionária.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção *in vitro* de embriões (PIV) bovinos permite o aumento da eficiência produtiva e reprodutiva de animais alto valor genético, porém as taxas de desenvolvimentos embrionárias são relativamente inferiores quando comparadas a situação *in vivo*. Assim novas pesquisas com meios de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* devem ser estimuladas, visando resultados como a maior produção e qualidade dos embriões produzidos *in vitro*. Apesar dos resultados obtidos, estudos que utilize fatores do crescimento ao diluidor do sêmen devem ser aprofundados, principalmente utilizando sêmen sexado e/ou vacas superovuladas.

## REFERÊNCIAS

ALESSI, D. R.; COHEN, P. Mechanism of activation and function of protein kinase B. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 8, p. 55–62, 1998.

ALI, A. A.; BILODEAU, J. F.; SIRARD, M. A. Antioxidants requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. **Theriogenology**. v. 59, p. 939-949, 2003.

AMSTERDAM, A.; MAY, J. V.; SCHOMBERG, D. W. Synergistic Effect of insulin and follicle-stimulating hormone on biochemical and morphological differentiation of porcine granulosa cells *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 379-390, 1988.

ANZAR, M.; GRAHAM, E. F. Filtration of bovine semen. Development of a Sephadex ion-exchange filter. **Animal Reproduction. Science**, n. 31, p. 187-195, 1993.

ANZAR, M.; GRAHAM, E. F. Effect of filtration on post-thaw quality of bull semen. **Theriogenology**, n. 43, p. 439-449, 1995.

ARMSTRONG, D. V. Heat Stress Interaction with Shade and Cooling. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 7, 1994.

AYOUB, M. A.; HUNTER, A. G. Inhibitory effect of bovine follicular fluid on *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Journal Dairy Science**. v. 76, p. 95-100, 1993.

BARNES, F. L.; EYESTONE, W. H. Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. **Theriogenology**, v. 33, p. 141-152, 1990.

BARUSELLI, P. S.; AYRES, H.; SOUZA, A. H.; MARTINS, C. M.; GIMENES, L. U.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S. Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de corte. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2, 2006, Londrina, PR. **Anais do 2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo**, v. 1, p. 113-132, 2006.

BATTAGLIA, D. F.; BOWEN, J. M.; KRASA, H. B. Endotoxin inhibits the reproductive neuroendocrine axis while stimulating adrenal steroids: a simultaneous view from hypophyseal portal and peripheral blood. **Endocrinology**, v. 138, n. 10, p. 4273 – 4281, 1997.

BAVISTER, B. D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Human Reproduction**, v. 1, p. 91–148, 1995.

BENITO, M.; VALVERDE, A. M.; LORENZO, M. IGF-I A mitogen also involved in differentiation processes in mammalian cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 28, p. 499 –510, 1996.

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

BETTS, D. H.; KING, W. A. Genetic regulation of embryo death and senescence. **Theriogenology**, v. 55, p. 171–191, 2001.

BIGGERS, J. D.; WHITTINGHAM, D. G.; DONAHUE, R. P. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 58, p. 560–567, 1967.

BLOCK, J.; WRENZYCKI, C.; NIEMANN, H.; HERRMANN, D.; HANSEN, P. J. Effects of insulin-like growth factor-1 on cellular and molecular characteristics of bovine blastocyst produced *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 895–903, 2008.

BOLS, P. E. J.; VAN SOOM, M. T.; YSEBAERT, *et al.* Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. **Theriogenology**, n. 45, p. 1001-1014, 1996.

BOLS, P. E. J. *et al.* Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity bovine compact cumulus oocyte complexes. **Theriogenology**, v. 47, p. 1221-1236, 1997.

BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; BRISSON, C.; CARBONEAU, G.; DUROCHER, J. *In vitro* embryo production in the cow: An effective alternative to the conventional embryos production approach. **Theriogenology**, v. 51, p. 59–70, 1999.

BREEN, K. M.; KARSCH, F. J. Does Cortisol Inhibit Pulsatile Luteinizing Hormone Secretion at the Hypothalamic or Pituitary Level? **Endocrinology**, v. 145, n. 2, p. 692-698, 2004.

BRICKELL, J. S.; BOURNE, N.; CHENG, Z.; WATHES, D. C. Influence of plasma IGF-1 concentrations and body weight at 6 months on age at first calving in dairy heifers on commercial farms. **Reproduction in Domestic Animals**, n. 42, (Suppl. 2) p. 118, 2007.

BRISON, D. R.; SCHULTZ, R. M. Apoptosis during mouse blastocyst formation: formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor? **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 1088–1096, 1997.

BRINSTER, R. L.; THOMSON, J. L. Development of eight-cell mouse embryos *in vitro*. **Experimental Cell Research**, v. 42, p. 308–315, 1966.

BYRNE, A.T.; SOUTHGATE, J.; BRISON, D. R.; LEESE, H. J. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 117, p. 97–105, 1999.

CALLESEN, H.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, F. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. **Theriogenology**, v. 27, p. 217, 1987. (Abstract).

CARAYANNOPOULOS, M. O.; CHI, M. M. Y.; CUI, Y.; PINGSTERHAUS, J. M.; MCKNIGHT, R. A.; MUECKLER, M.; DEVASKAR, S. U.; MOLEY, K. H. GLUT8 is a glucose transporter responsible for insulin-stimulated glucose uptake in the blastocyst. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 7313–7318, 2000.

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

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

COCERO, M. J.; ALABART, J. L.; HAMMAMI, S.; MARTÍ, J. I.; LAHOZ, B.; SÁNCHEZ, P.; ECHEGOYEN, E.; BECKERS, J. F.; FOLCH, J. The efficiency of *in vitro* ovine embryo production using an undefined or a defined maturation medium is determined by the source of the oocyte. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 46, p. 463-470, 2011.

CONAGHAN, J.; HANDYSIDE, A. H.; WINSTON, R. M. L.; LEESE, H. J. Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 87–95. 1993.

CHOI, Y. H.; TAKAGI, M.; KAMISHITA, H. *et al.* Developmental capacity of bovine oocytes matured in two kinds of follicular fluid and fertilized *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, n. 50, p. 27-33, 1998.

DAFTARY, S. S.; GORE, A. C. IGF-1 in the brain as a regulator of reproductive neuroendocrine function. **Experimental Biology and Medicine**, v. 230, p. 292–306, 2005.

DALLE, S.; RICKETTS, W.; IMAMURA, T.; VOLLENWEIDER, P. e OLEFSKY, J. M. Insulin and insulin-like growth factor I receptors utilize different G protein signaling components. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 688–695, 2001.

DAUGHADAY, W. H.; HALL, K.; RABEN, M. S.; SALMON, W. D. Jr, VAN DEN BRANDE J. L.; VAN WIK J. J. Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. **Nature** v. 235, p. 107, 1972

DE SOUSA, P. A.; WATSON, A. J.; SCHULTZ, R. M. Transient expression of a translation initiation factor is conservatively associated with embryonic gene activation in murine and bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 969–977, 1998.

DEVREKER, F.; HARDY, K. Effects of glutamine and taurine on preimplantation development and cleavage of mouse embryos *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 921–928, 1997.

DOMINKO, T.; FIRST, N.L. Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 47, p. 456-467, 1997.

DOWNWARD, J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 10, p. 262–267, 1998.

ECHTERNKAMP, S. E.; ROBERTS, A. J.; LUNSTRA, D. D.; WISE, T.; SPICER, L. J. Ovarian follicular development in cattle selected for twin ovulations and births. **Journal of Dairy Science**, n. 82, p. 459–471, 2004.

ELMILEIK, A. M. A.; MAEDA, T.; TERADA, T. Higher rates of development into blastocyst following the *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured in a medium supplement with the fluid from large bovine follicles. **Animal Reproduction Science**, n. 38, p. 85-96, 1995.

EPSTEIN, C. J.; SMITH, S. A. Amino acid uptake and protein synthesis in preimplantation mouse embryos. **Developmental Biology**, v. 33, p. 171–184, 1973.

ESTIENNE, M. J.; KNIGHT, M. J.; BEAL, W. E. Isolation of a population of intact, highly-motile porcine spermatozoa using a discontinuous bovine serum albumin gradient. **Theriogenology**, n. 29, p. 771-778, 1988.

FARIN, C. E.; HASLER, J. F.; MARTUS, N. S. *et al.* A comparison of Menezos's B2 and tissue culture medium-199 for *in vitro* production of bovine blastocysts. **Theriogenology**, n. 48, p. 699-709, 1997.

FEICHTINGER, W.; KEMETER, P. Transvaginal sector scan sonography for needle guided transvaginal follicle aspiration and other applications in gynecologic routine and research. **Fertility and Sterility**, n. 45, p. 722-725, 1986.

FENWICK, M. A.; FITZPATRICK, R.; KENNY, D. A.; DISKIN, M. G.; PATTON, J.; MURPHY, J. J.; *et al.* Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 34, p. 31 - 44, 2008.

FERNANDES, C. E.; DODE, M. A. N.; GODOY, K.; RODOVALHO, N. Efeito estacional sobre características ovarianas e produção de oócitos em vacas *Bos indicus* no Mato Grosso do Sul. **Brazilian Journal Veterinarian Research Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 3, p. 131-135, 2001.

FLOOD, M. R.; GAGE, T. L.; BUNCH, T. D. Effect of various growth-promoting factors on preimplantation bovine embryo development *in vitro*. **Theriogenology**, v. 39, p. 823–833, 1993.

GANDOLFI, F.; MOOR, R. M. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 81, p. 23-28, 1987.

GARCIA, J. M., *et al.* *In vitro* production (IVP) of bovine embryos: different procedures. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, n. 26, p. 281, 1998.

GARDNER, D. K.; LEESE, H. J. Non-invasive measurement of nutrient uptake by single cultured preimplantation mouse embryos. **Human Reproduction**, v. 1, p. 25–27, 1986.

GARDNER, D. K.; LANE, M. The 2-cell block in CF1 mouse embryos is associated with an increase in glycolysis and a decrease in tricarboxylic acid (TCA) cycle activity: alleviation of the 2-cell block is associated with the restoration of *in vivo* metabolic pathway activities. **Biology of Reproduction**. v. 49, p. 52, 1993.

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, J. R.; BEAL, W. F.; KRISHER, R. L.; *et al.* Effect of once versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. **Theriogenology**, n. 42, p. 405-419, 1994.

GLISTER C.; TANNETA D. S.; GROOME N. P & KNIGHT P. G. Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by non-luteinized bovine granulosa cells. **Biology of Reproduction** v. 65, p. 1020–1028, 2001.

GONÇALVES, P. B. D. *et al.* Produção *in vitro* de Embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; GREVE, T.; LEHN-JENSEN, H.; RASBECH, N. O. Nonsurgical recovery of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 7, n. 4, p. 239-250, 1977.

GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MONTANGER, M.M.; COSTA, L. F. S. In: Produção *in vitro* de embriões. **Biotécnicas Aplicadas á Reprodução Animal**. São Paulo: Livraria Varela, 1 ed., p. 195-226, 2001.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 340, p. 2002.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: 2ª. ed., Roca, 395, p. 2008

GONG, J.G.; MCBRIDE, D.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis *in vitro*. **Journal of Endocrinology**. v. 143, p. 157–164, 1994.

GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. Cambridge, **University Press**, 1994. p. 30-142.

GUTIÉRREZ, C. G.; CAMPBELL, B. K.; WEBB, R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 608-616, 1997.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Folliculogenesis, Egg Maturation, and Ovulation. In: **Reproduction in farm animals**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, Cap. 5, p. 68-82, 2000.

HAFEZ, E. S. E. & HAFEZ, B. Foliculogênese, maturação oocitária e ovulação. **Reprodução Animal**, São Paulo: Manole, 7 ed., p. 69-82, 2004.

HANZEN, C.; GOFFIN, L. Use of ultrasonography for ovum pick-up (OPU) in the bovine. Review. **Annales de Medecine Veterinaire**, v. 142, p. 81-91, 1998.

HANSEN, J. P.; ARÉCHIGA, F. C. Strategies for Managing Reproduction in the Heat-Stressed Dairy Cow. **Journal Animal Science**. v. 77, p. 112-121, 1999.

HARDY, K. Apoptosis in the human embryo **Reviews of Reproduction**, v. 4, p. 125–134, 1999.

HARDY e SPANOS. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. **Journal of Endocrinology**, v. 172, p. 221-236, 2002.

HASLER, J. F. Commercial production of *in vitro* derived bovine embryos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, n. 24, p. 117-134, 1996.

HERNANDEZ-FONSECA, H. J.; SIRISATHIEN, S.; BOSCH, P.; CHO, H. S.; LOTT, J. D.; HAWKINS, L. L.; HOLLET, R. B.; COLEY, S. L.; BRACKETT, B. G. Offspring resulting from direct transfer of cryopreserved bovine embryos produced *in vitro* in chemically defined media. **Animal Reproduction Science**, v. 69, p. 151–158, 2002.

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

HERRLER, A.; KRUSCHE, C. A.; BEIER, H. M. Insulin and insulin- like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1302–1310, 1998.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International Review of Cytology**, v. 124, p. 43–101, 1991.

HOLM, P.; CALLESEN, H. *In vivo* versus *in vitro* produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. **Reproduction Nutrition Development**, v. 38, p. 579-594, 1998.

HOUGHTON, F. D.; THOMPSON, J. G.; KENNEDY, C. J.; LEESE, H. J. Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. **Molecular Reproduction and Development**, v. 44, p. 476–485, 1996.

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

ING, R. M. Y.; LI, D. Q.; HARDING, A. M. *et al.* A comparison of swim-down and swim-up methods for extraction of high motility sperm. **Fertility and Sterility**, n. 55 (4), p. 817-819, 1991.

JAAKMA, U.; ZHANG, B. R.; LARSSON, B. *et al.* Effects of sperm treatments on the *in vitro* development of bovine oocytes in semi-defined and defined media. **Theriogenology**, n. 48, p. 711-720, 1997.

KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**, n. 54, p. 741–756, 2000.

KUPKER, W.; DIEDRICH, K.; EDWARDS, R. G. Principles of mammalian fertilization. **Human Reproduction**, v. 13, p. 20-32, 1998.

LARON Z. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. **Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology**, v. 54, p. 311–316, 2001.

LECHNIAK, D.; CIESLAK, D.; SOSNOWSKI, J. Cytogenetic analysis of bovine parthenotes after spontaneous activation *in vitro*. **Theriogenology**, n. 49, p. 779–785, 1998.

LEE, E. S.; FUKUI, Y. Effect of various growth factors in a defined culture medium on *in vitro* development of bovine embryos matured and fertilized *in vitro*. **Theriogenology**, v. 44, p. 71–83, 1995.

LEESE, H. J. Metabolism of the preimplantation mammalian embryo. **Oxford reviews of reproductive biology**, v. 13, p. 35–72, 1991.

LEESE, H. J.; BARTON, A. M. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 72, p. 9–13, 1984.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. Factors determining competence of *in vitro* produced cattle embryos. **Theriogenology**, v. 51, p. 473-485, 1999.

LEQUARRE, A. S.; MARCHANDISE, J.; MOREAU, B.; MASSIP, A.; DONNAY, I. Cell cycle duration at the time of maternal zygotic transition for *in vitro* produced bovine embryos: effect of oxygen tension and transcription inhibition. **Biology of Reproduction**. v. 69, p. 1707–1713, 2003.

LIMA, P. F.; OLIVEIRA, L. A.; SANTOS, M. H.; REICHENBACH, H. D.; WEPPERT, M.; PAULA-LOPES F. F.; NETO, C. C.; GONCALVES, P. B. Effect of retinoids and growth factor on *in vitro* bovine embryos produced under chemically defined conditions. **Animal Reproduction Science**, v. 95, p. 184–192, 2006.

LIU, L.; TRIMARCHI, J. R.; NAVARRO, P.; BLASCO, M. A.; KEEFE, D. L. Oxidative stress contributes to arsenic-induced telomere sttrition, chromosome instability and apoptosis. **The Journal Biology Chemistry**, v. 26, p. 31998-32004, 2003.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; GORDON, I. Effect of time of transfer to granulosa cell monolayer and cell stage at 48 hours post-insemination on bovine oocyte development following IVM/IVF/LVC. **8th Meeting of the European Embryo Transfer Association Lyon**, 136 (Abstract), 1992

LONERGAN, P. *et al.* Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**. v. 37, p. 48-53, 1994.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A. C. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, n. 65, p. 137–152, 2006.

LOONEY, C. R. *et al.* Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. **Theriogenology**, v. 41, p. 67-72, 1994.

MARQUANT-LEGUIENNE, B.; HUMBLLOT, P. Practical measures to improve *in vitro* blastocyst production in the bovine. **Theriogenology**, v. 449, p. 3-11, 1998.

MASSIP, A. Cryopreservation of embryos of farm animals. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p. 49-55, 2001.

MATSUI, M.; TAKAHASHI, Y.; HISHINUMA, M.; KANAGAWA, H. Stimulation of the development of bovine embryos by insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) is mediated through the IGF-1 receptor. **Theriogenology**, v. 48, p. 605–616, 1997.

MATSUYAMA, K.; MIYAKOSHI, H.; FUKUI, Y. Effect of glucose levels during *in vitro* culture in synthetic oviduct fluid medium on *in vitro* development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. **Theriogenology**, v. 40, p. 595–605, 1993.

MCGEE, E. A.; HSUEH, A. J. W. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Reviews**. v. 21, p. 200–214, 2000.

MCGOWAN, K. M.; LONG, S. D. e PEKALA, P. H. Glucose transporter gene expression: regulation of transcription and mRNA stability. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 66, p. 465–505, 1995.

MEMILI, E.; FIRST, N. L. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. **Zygote**, v. 8, p. 87–96, 2000.

MERTON, J. S.; ROOS, A. P. W.; MULLAART, E.; RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS, P. L. A.; DIELEMAN, S. J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryos technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, p. 651-674, 2003.

MILLS, R. M.; BRINSTER, R. L. Oxygen consumption of preimplantation mouse embryos. **Experimental Cell Research**, v. 47, p. 337–344, 1967.

MINGOTI G. V. Aspectos técnicos da produção *in vitro* de embriões bovinos. In: **Simpósio Tópicos Avançados em Biotecnologias da Reprodução**, Jaboticabal: Jaboticabal, SP: UNESP, 2005.

MERTON, J. S.; DE ROOS, A. P. W.; MULLAART, E.; DE RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS PLAM; DIELEMAN, S. J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, p. 651-674, 2003.

NAGAI, T. The improvement of *in vitro* maturation system for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 55, p. 1.291-1.301, 2001.

NEIRA, J. A.; TAINTURIER, D.; PENA, M. A.; MARTAL, J. Effect of the association of IGF-I, IGF-II, bFGF, TGF-beta1, GM-CSF, and LIF on the development of bovine embryos produced *in vitro*. **Theriogenology**, v. 73, p. 595–604, 2010.

PALMA, G. A.; MULLER, M.; BREM, G. Effect of insulin-like growth factor-I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 110, p. 347–353, 1997.

PARAMIO M. T. *In vivo* and *in vitro* embryo production in goats. **Small Ruminant Research**, v. 89, p. 144-148, 2010

PARIA, B. C.; DEY, S. K. Preimplantation embryo development *in vitro*: cooperative interactions among embryos and role of growth factors, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 4756–4760, 1990.

PARRISH, J. J.; PARRISH, J. L.; FIRST, N. L. Effect of swim-up separation and heparin pretreatment of frozen thawed spermatozoa on *in vitro* fertilization of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, n. 30, p. 112, 1984.

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

PATTON, J.; KENNY, D.A.; MCNAMARA, S.; MEE, J.F.; OMARA, F.P.; DISKIN, M.G. *et al.* Relationships among milk production, energy balance, plasma analyses, and reproduction in Holstein–Friesian cows. **Journal of Dairy Science**, n. 90 p. 649–658, 2007

PEREIRA, C. C. J. **Fundamentos de Bioclimatologia Aplicados à Produção Animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2005.

PETTERS, R. M. Embryo development *in vitro* to the blastocyst stage in cattle, pigs and sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 415-421, 1992.

PIETERSE, M. C., *et al.* Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, n. 30, p. 751-762, 1988.

PIETERSE, M. C.; VOS, P. L. A. M.; KRUIP, T. A. M.; WURTH, Y. A.; VAN BENEDEN, T. H.; WILLIENSE, A. H.; TAVERNE, M. A. Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick up in eCG treated cows. **Theriogenology**, n. 37, p. 273, 1992.

PFAFFLM; SCHWARZ, F.; SAUERWEIN, H. Quantification of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) mRNA: modulation of growth intensity by feeding results in inter- and intra-tissue specific differences of IGF-1 mRNA expression in steers. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 106, p. 514–21, 1998.

QUETGLAS, M. D.; COELHO, L. A.; GARCIA, J. M.; OLIVEIRA FILHO, E. B.; ESPER, C. R. Effect of insulin-like growth factor-1 during *in vitro* oocyte maturation and *in vitro* culture of bovine embryos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v. 53, p. 1–5, 2001.

QUINN, P. Enhanced results in mouse and human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 12, p. 97–105, 1995.

RINDERKNECHT, E.; HUMBEL, R. E. Polypeptides with no suppressible insulin-like and cell-growth-promoting activities in human serum: isolation, chemical characterization, and some biological properties of forms I and II. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 73, p. 2365–2369, 1976a

RINDERKNECHT, E.; HUMBEL, R. E. Amino-terminal sequences of two polypeptides from human serum with no suppressible insulin-like and cell-growth-promoting activities: evidence for structural homology with insulin B chain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 73, p. 4379–4381, 1976b.

ROCHA *et al.* Produção *in vitro* de embriões ovinos: avanços e desafios. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 38, n. 2, p.103-109, 2014.

ROSENKRANS, C. F. JR.; ZENG, G. Q.; MCNAMARA, G. T. *et al.* Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. **Biology of Reproduction**. v. 49, p. 459–462, 1993.



SALMON, W. D. JR.; DAUGHADAY, W. H. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage *in vitro*. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine** v.149, p. 825–836, 1957.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, p. 799–806, 2001.

SANTOS JÚNIOR, E. R. Efeito do Estresse Térmico na Maturação *in vitro* de Oócitos Caprinos e Ovinos em Protocolos de Produção de Embriões. [Tese de Doutorado]. Recife, PE; UFRPE. [Acesso em 16 de julho de 2014]. Disponível em: [http://200.17.137.108/tde\\_busca/arquivo.php?codArquivo=691](http://200.17.137.108/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=691).

SCHINI, S. A.; BAVISTER, B. D. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. **Biology of Reproduction**. v. 39, p. 1183–1192, 1988.

SENEDA, M. M., C.S. ESPER, J. M. GARCIA, *et al.* Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, n. 67, p. 37-43, 2001.

SHABANKAREH, H. K.; ZANDI M. Developmental potential of sheep oocytes cultured in different maturation media: effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, and cysteamine, **Fertility and Sterility**, v. 94, p. 335–340, 2010.

SHARMA, G. T.; MAJUMDAR, A. C.; BONDE, S. W. Chronology of maturational events in goat oocytes cultured *in vitro*. **Small Ruminant Research**, v. 22, p. 25-30, 1996.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v. 49, p. 483-497, 1998.

SOMFAI, T.; KIKUCHI, K.; MEDVEDEV, S.; ONISHI, A.; IWAMOTO, M.; FUCHIMOTO, D.; OZAWA, M.; NOGUCHI, J.; KANEKO, H.; OHNUMA, K.; SATO, E.; NAGAI, T.

Development to the blastocyst stage of immature pig oocytes arrested before the metaphase-II stage and fertilized *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v. 90, p. 307-328, 2005.

SPANOS, S.; BECKER, D. L.; WINSTON, R. M. L.; HARDY, K. Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human preimplantation embryo development. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1413–1420, 2000.

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

SPICER, L. J.; CHAMBERLAIN, C. S. & MACIEL, S. M. Influence of gonadotropins on insulin- and insulin-like growth factor-I (IGF-I) induced steroid production by bovine granulosa cells. **Domestic Animal Endocrinology** v. 22, p. 237–254, 2002.

STEWART, R. E.; SPICER, L. J.; HAMILTON, D. T. & KEEFER, B. E. Effects of insulin-like growth factor I and insulin on proliferation and on basal luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine theca cells: involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone. **Journal of Animal Science**. v. 73, p. 3719–3731, 1995.

STROUD, B. K.; MYERS, M. W. Clinical results in a commercial *in vitro* fertilization (IVF) facility. **Acta Veterinariae**, v. 9, p. 105-230, 1993.

SUMMERS, S. A.; YIN, V. P.; WHITEMAN, E. L.; GARZA, L. A.; CHO, H.; TUTTLE, R. L. e BIRNBAUM, M. J. Signaling pathways mediating insulin-stimulated glucose transport. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 892, p.169–186, 1999.

THIBIER, M. International Embryo Transfer Society: Data Retrieval Committee Annual Report. **Embryo Transfer Newsletter**, n. 25, p. 15-20, 2007.

THOMPSON, J. G.; SIMPSON, A. C.; PUGH, C. W.; DONNELLY, P. E. Effect of oxygen concentration on *in vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, n. 89, p. 573–578, 1990.

THOMPSON, J. G.; SIMPSON, A. C.; PUGH, P. A.; TERVIT, H. R. Requirement for glucose during *in vitro* culture of sheep preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, p. 253–257, 1992.

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

THOMPSON, J. G.; PARTRIDGE, R. J.; HOUGHTON, F. D. *et al.* Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by *in vitro* derived bovine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, p. 299–306, 1996.

VAN SOOM, A.; VAN VLAENDEREN, I.; MAHMOUDZADEH, A. R.; DELUYKER, H.; DE KRUIF, A. Compaction rate of *in vitro* fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. **Theriogenology**, v. 38, p. 905-919, 1992.

VELAZQUEZ, M. A.; NEWMAN, M.; CHRISTIE, M.F.; CRIPPS, P.J.; CROWE, M.A.; SMITH, R. F. *et al.* The usefulness of a single measurement of insulin-like growth factor-1 as a predictor of embryo yield and pregnancy rates in a bovine MOET program. **Theriogenology**, n. 64, p. 1977–1994, 2005.

VELAZQUEZ, M. A.; KORSWE, K.; NIEMANN, H. The effects of physiological and non-physiological insulin-like growth factor-1 (IGF-1) concentrations on the *in vitro* development of bovine embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 202, 2008.

VELAZQUEZ, M. A.; ZARAZA, J.; OROPEZA, A.; WEBB, R.; NIEMANN, H. The role of IGF1 in the *in vivo* production of bovine embryos from super ovulated donors. **Reproduction**, v. 137, p. 161–180, 2009.

VINCENT, A. M.; FELDMAN, E. L. Control of cell survival by IGF signaling pathways. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 12, p. 193–197, 2002.

VOS, P. L. A. M., *et al.* Evaluation of transvaginal ultrasound-guided follicle puncture to collect and follicular fluids at consecutive times relative to the pre-ovulatory LH surge in eCG/PG treated cows. **Theriogenology**, n. 41, p. 829-840, 1994.

WAGTENDONK DE LEEUW, A. M.; MULAART, E.; DE ROOS, J. S. *et al.* Effects of different reproduction techniques: al, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. **Theriogenology**, v. 53, n. 2, p. 575-597, 2000.

WATSON, A. J.; WESTHUSIN, M. E.; WINGER, Q. A. IGF paracrine and autocrine interactions between conceptus and oviduct. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54 (Suppl.), p. 303–15, 1999.

WATSON, A. J.; NATALE, D. R.; BARCROFT, L. C. Molecular regulation of blastocyst formation. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 583-592, 2004.

WILLET, E. L. *et al.* Successful transplantations of fertilized bovine ovum. **Science**, v. 113, p.247, 1951.

XU, K. P.; YADAV, B. R.; KING, W. A.; BETTERIDGE, K. J. Sex-related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, p. 249-252, 1992.

YAKAR S.; LIU, J-L; STANNARD, B.; BUTLER, A.; ACCILI, D.; SAUR, B. *et al.* Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 7324–9, 1999.

YILMAZ, A.; DAVIS, M. E.; SIMMEN, R. C. M. Analyses of female reproductive traits in Angus beef cattle divergently selected for blood serum insulin-like growth factor I concentration. **Theriogenology**, n. 65, p. 1180–90, 2006.

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

WYLLIE, A. H. Glucocorticoid induced thymocytes apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. **Nature**, v. 284, p. 555-556, 1980.