

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA *IN VITRO* A PARTIR DE OÓCITOS BOVINOS
SELECIONADOS POR CORANTES VITAIS E MATURADOS EM MEIO
SUPLEMENTADO**

Mysa Tatiana Corrêa Gonçalves

São Luís - MA, Brasil
2013

MYSA TATIANA CORRÊA GONÇALVES

**PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA *IN VITRO* A PARTIR DE OÓCITOS BOVINOS
SELECIONADOS POR CORANTES VITAIS E MATURADOS EM MEIO
SUPLEMENTADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Animal.

Área: Reprodução Animal

Orientador

Prof. DSc. Ricardo de Macedo
Chaves

Co-orientador

Prof. DSc. Fernando Andrade Souza

São Luís - MA, Brasil

2013

Gonçalves, Maysa Tatiana Corrêa.

Produção embrionária *in vitro* a partir de oócitos bovinos selecionados por corantes vitais e maturados em meio suplementado / Maysa Tatiana Corrêa Gonçalves. – São Luís, 2013.

56 f

Dissertação (Mestrado) – Curso em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2013.

Orientador: Prof. Ricardo de Macêdo Chaves.

1. Azul cresil brilhante. 2. Azul de tripan 3. IGF-I. 4. Insulina. 5. Seleção oocitária. I.Título

CDU: 636.08

Dissertação de Mestrado aprovada em 10 de Maio de 2013 pela banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

DsC. Alessandra Corallo Nicacio
1º Membro

Prof. DsC. Fernando Andrade Souza
2º Membro

Prof. DsC. Ricardo de Macêdo Chaves
Orientador

*A Deus autor da vida e a minha família,
pois sem eles nada disso seria possível.*

AGRADECIMENTO

Depois de 2 anos de muito trabalho, problemas e soluções, tristezas e alegrias, eu só tenho a agradecer:

A Deus porque sem ele nada seria possível, a razão do meu existir e persistir apesar das adversidades da vida.

A minha família, minha base e porto seguro, por sempre me apoiarem nas minhas decisões e me ajudarem nas indecisões. Por serem meu exemplo e alicerce em todos os momentos da minha vida e sempre me incentivarem a persistir nos meus sonhos e objetivos.

A CAPES pela concessão da bolsa, essencial para a realização deste projeto.

Ao Prof. DsC. Ricardo de Macêdo Chaves, meu orientador, que me adotou como orientada de mestrado já no meio do caminho e acreditou na minha capacidade. Obrigada pela sua amizade e apreço, e por confiar em mim responsabilidades que eu mesma não acreditava conseguir.

Ao Prof. DsC. Fernando Andrade Souza, meu coorientador, por sempre me socorrer nas minhas dúvidas, cálculos e me incentivar a sempre testar novas coisas, afinal até a falta de resultados é resultado... rs.

A Profa. DsC. Anali Linhares Lima, pela minha análise estatística (pela dor de cabeça que meus dados lhe causaram) e por está sempre disponível a ajudar.

A todos do Laboratório de Reprodução Animal (LABRA) pela ajuda direta ou indireta na pesquisa, em especial ao LABRA produções (Sâmara Pinto, Naia Alves, Diego Almeida, Giovani Abreu, Hérica Cipriano, Paula Miranda e Israel Pires) pela ajuda durante o experimento, não teria conseguido sem vocês, obrigada pelos vários momentos de descontração e risadas, dentro e fora do laboratório, pois foram esses momentos que me ajudaram a continuar e não surtar durante o mestrado (rs), em vocês encontrei não só uma equipe

de trabalho, mas verdadeiros amigos, quero sempre contar com a amizade de vocês.

A DsC. Alessandra Corallo Nicacio, eterna professora, por ter me acolhido na reprodução, quando eu já tinha quase perdido as esperanças de trabalhar na área, ter me incentivado a fazer o mestrado e me orientado no início, além de tirar sempre minhas dúvidas. Sou extremamente grata a tudo que a senhora me ensinou (mesmo a distância rs) e principalmente por ter sua amizade.

Ao DsC. Felipe de Jesus Moraes Junior, pelas dicas quanto aos protocolos de PIVE, elas fizeram a total diferença na rotina do LABRA e no meu experimento.

Ao Médico Veterinário Hélio Fernandes Alves Monteles, e a todos do abatedouro DA Vital, pela super ajuda com os ovários e por sempre se dispor a ajudar, mesmo quando eu ligava em cima da hora.

Ao Laboratório de Patologia Molecular (Laboratório amigo para os íntimos), em especial a Larissa Sarmiento, Iara Oliveira e Rayule Lopes pelas várias vezes que nos emprestaram, cederam ou doaram algum equipamento ou material para o nosso laboratório.

As secretárias da Coordenação do mestrado, Rosângela, Fran e Gabriela, pelas inúmeras vezes que as importunei com declarações e ligações, obrigada pela compreensão e amizade de vocês.

A minha turma de mestrado, foi um prazer ter conhecido e convivido um pouco com todos vocês, em especial a Valéria Bittencourt, Elzivânia Gomes, Francineto Reis, Patrick Mourão, Inaldo Macêdo e Alessandra Lima. Obrigada por tudo, principalmente pela amizade de vocês.

A Dona Socorro, que sempre muito prestativa limpa o nosso laboratório do jeitinho que eu peço, mesmo que isso signifique aumentar um pouco mais o trabalho dela. Desculpe pelo incômodo D. Socorro e obrigadíssimo pela sua paciência e presteza.

PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA *IN VITRO* A PARTIR DE OÓCITOS BOVINOS SELECIONADOS POR CORANTES VITAIS E MATURADOS EM MEIO SUPLEMENTADO ¹

Autora: Mysa Tatiana Corrêa Gonçalves
Orientador: Ricardo de Macêdo Chaves
Coorientador: Fernando Andrade Souza

RESUMO

As condições de cultivo *in vitro* e a competência oocitária são os principais fatores relacionados aos baixos resultados da produção *in vitro* de embriões. Desta forma este trabalho teve por objetivo avaliar a taxa de produção embrionária *in vitro*, a partir de oócitos bovinos selecionados por coloração com Azul Cresil Brilhante (ACB) ou Azul de Tripán (AT), maturados em meio suplementado com Insulina e/ou IGF I. Os ovários foram obtidos de abatedouro e os oócitos recuperados por aspiração folicular com auxílio de seringa e agulha. Selecionou-se, sob estereomicroscópio, os oócitos graus I e II para coloração, por ACB a 26 μM (SIGMA[®]) por 60 minutos ou AT a 0,16% (VETEC[®]) por 10 minutos, a 38,5°C, 5% CO₂, 90% de umidade. Após a coloração os oócitos foram lavados 3 vezes em DMPBS (NUTRICELL[®]) para classificação e separação em corados (ACB+ ou AT+) e não corados (ACB- ou AT-). Apenas os oócitos ACB+, AT+ e AT- foram submetidos às etapas subsequentes de maturação *in vitro* em meios sem suplementação (controle), suplementado com IGF I (10 ng/ mL), suplementado com insulina 12 UI/ mL ou suplementado com IGF I (10 ng/ mL) e Insulina (12 UI/ mL), fecundação *in vitro* e cultivo *in vitro*. No D8 do cultivo os oócitos foram avaliados quanto, produção e qualidade dos blastocistos, de acordo com a coloração e o meio de maturação. Quanto aos oócitos ACB+, observou-se que não houve diferença estatística em relação às taxas de clivagem, produção e qualidade dos blastocistos com a suplementação do meio de maturação. Tanto os oócitos AT+, quanto os AT- apresentaram bom desenvolvimento embrionário, em torno de 71% (AT+) e 89% (AT-) o que indica que o AT não é uma ferramenta muito eficiente de auxílio à seleção. Quanto ao meio de maturação utilizado pelos oócitos submetidos ao AT, notou-se que a suplementação com insulina proporcionou melhores resultados quanto à taxa de produção de blastocistos e a qualidade destes. Concluindo, desta forma, que o ACB é um corante eficaz no auxílio à seleção de oócitos mais competentes, e que a suplementação do meio de maturação com insulina ou IGF I melhora as taxas de produção e qualidade dos blastocistos, porém em oócitos já selecionados quanto à capacidade de desenvolvimento oocitário, esse aumento não é significativo.

Palavras-Chave: Azul Cresil Brilhante, Azul de Tripán, IGF I, Insulina, Seleção oocitária

¹ Dissertação de Mestrado em Ciência Animal – Reprodução Animal, Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão, MA, (56p.) Maio 2013.

EMBRYO PRODUCTION FROM SELECTED OOCYTES WITH VITAL DYES AND MATURED IN SUPPLEMENTED MEDIUM

Author: Maysa Tatiana Corrêa Gonçalves

Adviser: Ricardo de Macêdo Chaves

Co – adviser: Fernando Andrade Souza

ABSTRACT

Culture conditions *in vitro* and oocyte competence are the major factors related to embryonic *in vitro* production low results. Therefore, this study aimed to evaluate *in vitro* embryo production rates of bovine oocytes selected with Brilliant Cresyl Blue (BCB) or Trypan Blue (TB), matured in supplemented medium with insulin and / or IGF I. Ovaries were obtained from abattoir and the oocytes were collected by follicular aspiration using syringe and needles. Grade I and II oocytes were selected under stereomicroscope and stained with BCB (SIGMA[®]) for 60 minutes at 26 µM or for 10 minutes using TB at 0.16% (VETEC[®]), at 38,5 °C, 5% CO₂, 90% humidity. After staining, oocytes were washed 3 times with DMPBS (NUTRICELL[®]) and separated in stained (BCB+ or TB+) or unstained (BCB- or TB-). Only BCB+, TB+ and TB- oocytes underwent for subsequent steps of *in vitro* maturation in medium without supplementation (control group), supplemented with IGF I (10 ng / mL), supplemented with insulin (12 IU / mL) and supplemented with IGF I (10 ng / mL) and insulin (12 IU / mL), *in vitro* fertilization and *in vitro* culture. At D8, oocytes were evaluated for cleavage, yield and quality of blastocysts, according to the stain and maturation medium. As for BCB+ oocytes, we observed that there was no statistical difference in production and quality rates of blastocysts with supplemented maturation medium. TB+ and TB- oocytes showed good embryo development, around 71% (TB+) e 89% (TB-) indicating that TB is not a very efficient tool for oocyte selection. Regarding maturation medium used for oocytes undergoing TB, it was noted that supplementation with insulin provided better results as the production rate and quality of these blastocysts. We can conclude that BCB is an effective dye for the selection of the most competent oocytes, and that insulin or IGF I supplemented maturation medium improves quality and production rate of blastocysts, but in oocytes that had already been selected for development ability, this increase is not significant.

Key Words: Brilliant Cresyl Blue, IGF I, Insulin, Oocyte selection, Trypan Blue

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Oogênese e Foliculogênese	17
2.2 Seleção Morfológica dos COCS para PIVE.....	18
2.3 Glicose-6-Fosfato Desidrogenase	19
2.4 Seleção por Azul Cresil Brilhante	20
2.5 Seleção Azul de Tripan	21
2.6 Sistema IGF.....	22
2.6.1 IGF I	22
2.6.2 Receptores de IGF I	24
2.6.3 Papel na Maturação Oocitária e Desenvolvimento Embrionário	25
2.7 INSULINA	26
2.7.1 Receptores	27
3. HIPÓTESE	29
4. OBJETIVOS	30
4.1 Geral	30
4.2 Específicos	30
5. MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1 Obtenção dos Oócitos	31
5.2 Procura e Seleção Morfológica	31
5.3 Coloração dos COCs por Azul Cresil Brilhante (ACB) ou Azul de Tripan (AT)	32
5.4 Grupos Experimentais	32
5.5 Maturação Oocitária	33
5.6 Preparação Espermática e Fertilização <i>in vitro</i>	34
5.7 Cultivo Embrionário	34
5.8 Análise Estatística	35

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÕES	42
Referências	43

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	QUADROS	Página
1.	Grupos experimentais conforme suplementação do meio de maturação de oócitos submetidos à coloração por ACB.	33
2.	Grupos experimentais conforme suplementação do meio de maturação de oócitos submetidos à coloração por AT.	33

TABELAS

1.	Desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i> de oócitos bovinos selecionados pela coloração Azul Cresil Brilhante (ACB+), no D8 do cultivo, e maturados em meio suplementado com IGF I (10 ng/mL) e/ou Insulina (12UI/ mL). São Luis – MA, 2013.	38
2.	Desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i> de oócitos bovinos selecionados pela coloração Azul de Tripán (AT+ e AT -), no D8 do cultivo, e maturados em meio suplementado com IGF I (10 ng/mL) e/ou Insulina (12UI/ mL). São Luis – MA, 2013.	40

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Oócitos corados por ACB, demonstrando o citoplasma azulado (ACB +)	36
2. Oócitos corados por AT, apresentando – se corado em azul (AT +)	37
3. Oócito não corado por AT, apresentando – se incolor (AT -)	37
4. Oócitos apresentando expansão das células do <i>cumulus</i> , após o processo de maturação <i>in vitro</i> .	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

			Pag
1.	μL	Microlitro	33
2.	μM	Micromolar	32
3.	ACB	Azul Cresil Brilhante	20
4.	AT	Azul de Tripán	21
5.	ATP	Adenosina Trifosfato	19
6.	CO²	Dióxido de Carbono	32
7.	COCs	Complexos <i>cumulus oophorus</i>	16
8.	DMPBS	Solução Salina Fosfatada Tamponada Modificada de Dulbecco	31
9.	DNA	Ácido Desoxirribonucléico	19
10.	FC	Fator de Crescimento	25
11.	FIV	Fecundação <i>in vitro</i>	15
12.	FSH	Hormônio Folículo Estimulante	24
13.	G6PDH	Glicose – 6 – fosfato desidrogenase	19
14.	GH	Hormônio do Crescimento	23
15.	GH – IH	Hormônio inibidor de Hormônio do Crescimento	23
16.	GHRH	Hormônio Regulador de Hormônio do Crescimento	23
17.	IGF	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina	22
18.	IGF I	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1	22
19.	IGFBP	Proteínas de Ligação de IGF	22
20.	IGF-IR	Receptor de Membrana de IGF do tipo I	24
21.	IGF-IIR	Receptor de Membrana de IGF do tipo II	24
22.	IR	Receptor de Membrana de Insulina	27
23.	IRS	Substrato do Receptor de Membrana da Insulina	28
24.	kDA	KiloDalton	23
25.	LH	Hormônio Luteinizante	22
26.	MIV	Maturação <i>in vitro</i>	15
27.	NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato	21
28.	NADPH	Nicotinamida Adenosina Dinucleótido Fosfato Oxidase	19
29.	ng	Nanogramas	23
30.	PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas	25
31.	PHE	Penicilamina, Hipotaurina e Epinefrina	34
32.	PIVE	Produção <i>in vitro</i> de Embriões	15
33.	PPP	Via Pentose Fosfato	19
34.	RNA	Ácido Ribonucléico	19
35.	RNAm	Ácido Ribonucléico mensageiro	22
36.	SAS[®]	Statistical Analysis System	35
37.	SFB	Soro Fetal Bovino	33
38.	SOF	Fluído Sintético de Oviduto	35
39.	UI	Unidades Internacionais	32

1. INTRODUÇÃO

Os bovinos estão entre as espécies domésticas cujas fêmeas são consideradas predominantemente monovulatórias, ou seja, somente um folículo chega a ovular ao final de cada ciclo estral (FORTUNE, 1994). Desta forma, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem sido utilizada para reduzir o intervalo entre gerações e aumentar a intensidade de seleção (CÓRDOVA et al., 2011). Porém, apenas 40% dos oócitos maturados *in vitro* atingem o estágio de blastocisto, contra 80% dos oócitos ovulados na produção *in vivo* de embriões bovinos (LONERGAN e FAIR, 2008). Parte destes resultados deve-se a falta de sistemas de cultivo, *in vitro*, de oócitos e embriões que mimetizem todas as condições fisiológicas *in vivo* e de meios de cultivo que possuam todos os constituintes necessários para a maturação, fecundação e cultivo embrionário (FEUGANG et al., 2009).

Acredita-se que ocorra uma falha dos oócitos em alcançarem uma adequada maturação citoplasmática nas condições *in vitro*, particularmente na reorganização das organelas citoplasmáticas e início da síntese de várias proteínas importantes para o desenvolvimento do futuro embrião (SUZUKI et al., 2003).

Outro fator importante é a qualidade dos oócitos selecionados, pois segundo Fatehi et al. (2005), a presença das células do *cumulus* é benéfica para a obtenção de embriões após a fecundação *in vitro* (FIV), visto que oócitos desnudos têm baixa taxa de clivagem. Estudos mostram que não há maturação, ou esta ocorre em menor escala, quando as células do *cumulus* são removidas antes dos oócitos serem maturados *in vitro* (GONÇALVES et al., 2002).

Apesar da qualidade do oócito estar diretamente relacionada à quantidade de células do *cumulus* e ao grau de compactação destas (MADISON et al., 1992), os baixos resultados da técnica de PIVE podem ser justificados pela baixa qualidade dos oócitos que são selecionados para a maturação *in vitro* (MIV), 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).

Assim, as condições de cultivo *in vitro* e a competência oocitária são seguramente os dois principais fatores relacionados aos baixos resultados da PIVE (RUSSEL et al., 2006; CAMARGO et al., 2006). Por essa razão, além dos critérios morfológicos de avaliação dos COCs (Complexos *cumulus oophorus*), a busca por critérios moleculares também tem ganho espaço nas pesquisas nos últimos anos (WANG e SUN, 2007).

Visto o exposto, estudos que visem a melhor seleção dos oócitos submetidos à PIVE, assim como um incremento no índice de embriões produzidos são de grande interesse tanto no âmbito das pesquisas, como no âmbito comercial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE

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 den 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).

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).

O oócito circundado pelas células da granulosa desenvolve uma forte associação interdependente com essas células durante a foliculogênese através de junções do tipo *gap*, onde destas células provêm fatores de

crescimento, nutrientes e outros fatores ainda não identificados que influenciam no crescimento e na maturação do oócito (FAGBOHUN e DOWNS, 1991).

2.2 SELEÇÃO MORFOLÓGICA DOS COCs PARA PIVE

A seleção dos oócitos imaturos de mamíferos para utilização na fecundação *in vitro* é realizada rotineiramente pela visualização de aspectos morfológicos, como a quantidade de camadas de células do *cumulus*, grau de compactação destas e homogeneidade do ooplasma (GORDON, 2003).

Segundo Vassena et al. (2003), a qualidade do oócito é de suma importância nas tecnologias de reprodução assistida. A presença das células do *cumulus* é benéfica para a obtenção de embriões após a FIV, pois oócitos desnudos têm baixa taxa de clivagem (FATEHI et al., 2005). Estudos mostram que não há maturação, ou esta ocorre em menor escala, quando as células do *cumulus* são removidas antes dos oócitos serem maturados *in vitro* (GONÇALVES et al., 2002).

Dentre as várias classificações utilizadas para estabelecer a qualidade dos oócitos, uma das mais utilizadas é a de Lonergan (1992), que classificou os complexos *cumulus oophorus* (COCs) em 5 grupos de qualidade, de acordo com os aspectos morfológicos: **Grau I** - apresentam mais de três camadas de células do *cumulus* compactas; **Grau II** - apresentam menos de três camadas de células do *cumulus* compactas rodeando completamente o oócito; **Grau III** - apresentam apenas uma camada de células do *cumulus*; **Desnudo** - ausência de camada de células do *cumulus* e, **Atrésicos** - possuem células do *cumulus* em regressão celular.

Tradicionalmente, os parâmetros morfológicos como a homogeneidade do ooplasma, número de camadas de células do *cumulus*, e compactação destas camadas celulares são utilizadas como critérios para prever a competência do oócito em se desenvolver (EBNER et al., 2003). Entretanto, a acurácia desta seleção é subjetiva, apresentando variações de acordo com o avaliador (WANG e SUN, 2007).

Além disso, o oócito bovino apresenta um ooplasma escuro o que dificulta essa avaliação quanto à presença de granulações e vacúolos (BORINI et al., 2005). Neste sentido é crescente a busca por métodos de seleção que sejam mais precisos e não invasivos.

2.3 GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) é uma enzima na via da pentose fosfato (PPP) que desempenha um papel no fornecimento de energia às células por meio da manutenção do nível de Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH), que é um transportador de energia química na forma de poder redutor (MANGIA e EPSTEIN, 1975; LEHNINGER et al., 1995).

A G6PDH é sintetizada durante a oogênese quando os oócitos se encontram em sua fase de crescimento, demonstrando desta forma sua importância na capacidade de desenvolvimento oocitária, 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 COCs em comparação com as células do *cumulus* individuais.

A via da pentose fosfatase pode ser dividida em dois estágios, oxidativo e não oxidativo, e a glicose pode entrar no PPP em qualquer

fase. A oxidação da glicose-6-fosfato para 6-fosfogliconolactona por ação da G6PDH resulta na produção de NADPH e frutose-6-fosfato, que pode também ser utilizada através do braço não-oxidativo da PPP pela ação da transcetolase (SUTTON-MCDOWALL et al., 2010).

Os produtos da PPP incluem NADPH, o qual é utilizado para a integridade citoplasmática e estado redox (redução – oxidação) por meio da redução da glutatona. O outro produto da PPP é o fosforibosil pirofosfatase, um substrato para a síntese de purinas para controle posterior da maturação nuclear. Desta forma, a atividade da PPP dentro dos oócitos é importante tanto para a maturação nuclear, quanto para a citoplasmática pelo fornecimento de substratos para a síntese de purina e manutenção do estado redox intra-oócito (SUTTON-MCDOWALL et al., 2010).

2.4 SELEÇÃO POR AZUL CRESIL BRILHANTE

Na busca por métodos não invasivos de seleção de COCs, 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 da ação de G6PDH e pode, portanto, ser utilizada para mensuração da atividade intracelular desta enzima (ALM et al., 2005).

O critério de seleção via ACB leva em conta à atividade da enzima G6PDH, a qual participa ativamente do metabolismo de oócitos e sua atividade é marcada como sendo inferior em oócitos que atingiram seu diâmetro final (ALM et al., 2005).

Este teste facilita a seleção dos oócitos completamente desenvolvidos (corados em azul) daqueles em desenvolvimento (não corados) (ROCA et al., 1998).

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, Alm et al. (2005) sugeriram que o ACB funcionaria como um acceptor de elétrons durante a oxidação da glicose-6-fostato e

redução de NADP⁺ na presença de suficiente atividade de G6PDH durante a via das pentoses fosfato (PPP).

Assim, os oócitos que tenham atingido a sua fase de crescimento possuem baixa atividade da G6PDH, não sendo possível reduzir o ACB a um composto incolor, exibindo então um citoplasma de cor azul (ACB+) e os oócitos em crescimento com atividade elevada da G6PDH, são capazes de reduzir o composto azul, o que resulta em um oócito de citoplasma incolor (ACB-).

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 (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ 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 fecundação, constituindo uma ferramenta potencial de seleção de oócitos mais competentes sem contudo prejudicar seu potencial de maturação.

2.5 SELEÇÃO POR AZUL DE TRIPAN

O azul de tripan (AT) é um corante supravital, bastante utilizado para a determinação da viabilidade celular, baseando-se na perda da integridade da membrana celular das células não viáveis, causando a captação do corante (MACIEL et al., 2002).

Visto que, a membrana plasmática é responsável pela manutenção do equilíbrio osmótico, atuando como uma barreira entre o meio intra e extracelular, lesões nesta estrutura podem levar a perda da homeostase celular, levando a morte da célula (FLESH e GADELLA, 2000).

A técnica de coloração pelo AT define a morte celular como uma alteração nas propriedades da membrana, assim em uma célula morta este corante se difunde rapidamente para dentro do citoplasma, enquanto que em células vivas a membrana plasmática não permite a penetração do corante (SPIKES, 1998)

Por ser um corante carregado negativamente e não lipofílico, o AT não reage com a célula, não penetrando na mesma, a não ser que esta apresente alguma lesão de membrana (WILSON et al., 1969; BASTOS et al., 2007). As células vivas, viáveis, não são coradas devido aos seus controles de transporte transmembrana, que não permitem a ligação, e conseqüentemente a passagem, do azul de tripan (DIB et al., 2009).

Há antecedentes do uso do AT para determinação da viabilidade celular durante a produção *in vitro* em diversas espécies, porém essas informações em bovinos são escassas (FILIPIAK e LAROCCA, 2012). O seu uso já foi relatado em células fetais germinativas (KATO e TSUNODA, 1996), folículos pré-antrais (JEWGENOW e STOLTE, 1996) e oócitos de hamsters e búfalas (LEWIN et al., 1990; GUPTA et al., 2002).

2.6 SISTEMA IGF

Diversas evidências têm mostrado que um sistema formado pelos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF) e às proteínas de ligação de IGF (IGFBP) exerce importantes funções no controle do desenvolvimento e atresia folicular em animais domésticos, estas podem ser encontradas nos fluidos biológicos e atuam inibindo ou potencializando a ação dos dois tipos de IGFs (IGF I e II) nas células-alvo (MONGET et al., 2002).

O sistema IGF pode estar envolvido também na manutenção e na regressão do corpo lúteo, após a ovulação, pois foi demonstrado um efeito regulatório do hormônio luteinizante (LH) sobre a expressão do RNAm que codifica o IGF I em corpo lúteo de ovinos (HASTIE e HARESIGN, 2006).

2.6.1 IGF I

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina I e II são peptídeos de baixo peso molecular, com similaridades estruturais e metabólicas à pró-insulina, conhecidos como somatomedinas. Eles são membros de uma família de peptídeos relacionados à insulina e podem

participar na maturação do oócito, ovulação, implantação e embriogênese. (YOSHIMURA, 2003).

O IGF I e o IGF II são cadeias polipeptídicas simples (~7,6 kDa) que retêm 70% da homologia dos aminoácidos entre eles e uma homologia de 50% com a estrutura da pró-insulina. A sequência de aminoácidos é altamente conservada entre as espécies, mostrando que o IGF I apresenta 100% de homologia entre humanos, suínos, ovinos e bovinos, e 96% para o IGF II entre humanos e bovinos (ODLE et al., 1996).

Embora tradicionalmente visto como um produto hepático, o IGF I pode ser sintetizado em vários outros tecidos, nos quais desempenha importantes papéis autócrinos e parácrinos (DAUGHADAY e ROTWEIN, 1989).

A síntese dos IGFs é regulada pelo eixo GH-IGF. O hipotálamo secreta hormônio liberador de hormônio de crescimento (GHRH) e hormônio inibidor de hormônio do crescimento (GH - IH) ou somatostatina. O GHRH age na hipófise anterior estimulando a secreção de hormônio de crescimento (GH) que age primariamente no fígado estimulando a produção e a liberação de IGF I. O GH é o principal estimulador da produção de IGF I, mas não de IGF II. A secreção do GH também é estimulada pela grelina, que é secretada pelo estômago e hipotálamo (MARTINELLI JR et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008).

O desenvolvimento folicular cíclico é dependente da cascata de estimulação gonadotrófica para regular o subsequente desenvolvimento das células da granulosa. Os IGFs podem atuar isoladamente e o mais importante, podem atuar em sinergia com as gonadotrofinas na estimulação de uma variedade de funções das células da granulosa (MACHADO, 2007).

Estudos *in vitro* e *in vivo*, na espécie bovina, têm demonstrado a participação direta do IGF I e suas proteínas ligantes (IGFBPs) na dinâmica folicular, sendo esses os principais responsáveis pela divergência e posterior dominância folicular (RIVERA et al., 2001; GINTHER et al., 2004).

Ginther et al. (2002; 2003), em suas pesquisas observaram que a concentração de IGF I no líquido folicular de bovinos está entre 10 e 20 ng/mL, e a variação desses níveis nos fluidos foliculares de folículos de diversos tamanhos é pequena, e as concentrações medidas estão sempre dentro de

parâmetros que são efetivos para estimular a proliferação celular e a esteroidogênese nas células da granulosa *in vitro*.

2.6.2 Receptores de IGF I

O sistema IGF possui dois tipos de receptores, o receptor do tipo I, ou seja, IGF-IR, e o receptor do tipo II (IGF-IIR) ou IGF-II/manose-6-fosfato (ADASHI, 1998).

O IGF-IR é um heterotetrâmero que consiste de duas subunidades α e duas β e possui uma expressiva homologia com o receptor da insulina (LeROITH et al., 1995). As regiões ricas em cisteína das subunidades α do receptor de insulina e do receptor do tipo I de IGF são 64-67% homólogas, enquanto que os domínios da tirosina quinase das subunidades β são 84% homólogas. Em adição ao IGF I, o receptor do tipo I de IGF também pode ligar IGF II e insulina, embora com uma afinidade menor, bem como parece interagir com as IGFBPs (MOHSENI-ZADEH e BINOUX, 1997).

O IGF-IR é o principal mediador das ações semelhantes à somatomedina, tanto do IGF I como do IGF II. Em bovinos o IGF-IR é expresso nas células da teca e da granulosa de folículos pré-antrais e antrais de bovinos, sendo a expressão pelas células da granulosa maior em comparação com as células da teca. O aumento na expressão de IGF-IR é concomitante ao aumento dos receptores de FSH e LH enquanto os folículos crescem, sugerindo que o IGF I seja fundamental durante a diferenciação precoce dos folículos (STEFANELLO et al. 2006; ARMSTRONG et al. 2000).

Diferentes estímulos fisiológicos e patológicos afetam a expressão do gene do receptor tipo I e sua ligação ao IGF I, como o status nutricional do animal, que possui importante influência na expressão e atividade de seu receptor (WERNER et al., 1992; LeROITH et al., 1995).

2.6.3 Papel na maturação oocitária e desenvolvimento embrionário

Vários estudos têm demonstrado a importância de fatores de crescimento (FCs) produzidos pelo ovário na maturação nuclear nas diferentes espécies de mamíferos. Entre os diversos FCs relacionados com ação na maturação nuclear estão o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e IGF I (HARPER e BRACKETT, 1993).

O IGF I associado ao FSH regula a proliferação das células da granulosa, expansão das células do *cumulus oophorus* e atuam na indução da atividade esteroideogênica na regulação folicular (ARMSTRONG et al., 1996). Receptores de IGF I estão presentes em COCs (NUTTINCK et al., 2004) e embriões no estágio de pré-implantação (LONERGAN et al., 2000) sugerindo a importância deste fator de crescimento na função oocitária e embrionária.

Vários autores demonstraram que o sistema IGF desempenha importante papel na foliculogênese, participando do crescimento, dominância, desvio e maturação folicular (FORTUNE et al., 2004; GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2000; LOUHIO et al., 2000; ZHAO et al., 2001; ITOH et al., 2002) e oocitária (ITOH et al., 2002; WALTERS et al., 2006; LORENZO et al., 1994; SIROTKIN et al., 2000).

Componentes do sistema IGF expressos em oócitos participam acelerando o processo de maturação nuclear e favorecendo a competência oocitária (SAKAGUCHI et al., 2002).

A adição de IGF I ao meio de cultivo *in vitro* proporcionou um aumento na taxa de produção de mórulas e blastocistos (PALMA et al., 1997; PRELLE et al., 2001; MOREIRA et al., 2002; HERRLER et al., 1998; BLOCK et al., 2003; SIRISATHIEN et al., 2003) e no número de células no estágio de blastocisto (MOREIRA et al., 2002; BYRNE et al., 2002; SIRISATHIEN e BRACKETT, 2003; SIRISATHIEN et al., 2003), bem como reduziu a incidência de apoptose embrionária em humanos (LIGHTEN et al., 1998), em coelhos (HERRLER et al., 1998), em ratos (LIN et al., 2003; FABIAN et al., 2004) e em bovinos (LONERGAN et al., 1996; MOREIRA et al., 2002; JOUSAN e HANSEN, 2004; BYRNE et al., 2002; MAKAREVICH et al., 2002). O IGF I não

somente aumenta o número de embriões que chegam ao estágio de blastocisto, mas também acelera o desenvolvimento desses embriões (MOREIRA et al., 2002).

2.7 INSULINA

A insulina é uma proteína de 6 kDa composta por duas cadeias polipeptídicas ligadas por uma ponte dissulfídrica, sendo um potente hormônio anabólico em diferentes tipos celulares (SALTIEL e KAHN, 2001). A insulina estimula o transporte de glicose e aminoácidos (SUMMERS et al., 1999) e a síntese de RNA, proteína e glicogênio (McGOWAN et al., 1995), além de possuir propriedades mitogênicas e anti-apoptóticas (DALLE et al., 2001).

Existem diferenças estruturais na insulina entre as diferentes espécies. A insulina bovina difere da humana por apresentar uma alanina substituindo uma treonina nas posições A8 e B31, e uma valina substituindo uma isoleucina na posição A10 (TRENKLE, 1972). Estas diferenças acabam por conferir variações na massa molecular e ponto isoelétrico da insulina entre as espécies. Porém apesar das diferenças, existe bioatividade cruzada entre as insulinas, mesmo que em intensidade variada (LADISCH e KOHLMANN, 1992; FERNANDES et al., 2007).

Juntamente com seus receptores, a insulina têm se mostrado importante para os eventos relacionados à reprodução. Na espécie bovina, demonstrou-se que a insulina, quando adicionada ao meio de maturação *in vitro*, acelera a progressão da meiose e tem efeito positivo na clivagem embrionária (BORTOLOTTO et al., 2001).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que a insulina é um potente estimulador da diferenciação e esteroidogênese folicular (DISKIN et al., 2003). De fato, trabalhos realizados com cultivos de células bovinas evidenciaram que a insulina estimula tanto a mitose, quanto a produção de esteroides nas células da granulosa, da teca e nas células luteais (GUTIERREZ et al., 1997; STEWART et al., 1995; MAMLUK et al., 1999). Armstrong et al. (2002) verificaram que as células da granulosa bovina são extremamente

dependentes da presença das concentrações fisiológicas de insulina, onde foi observado um aumento na produção de estradiol em pequenos folículos antrais (1 a 4 mm).

Em meio quimicamente definido, o uso de insulina e IGF I incrementam o percentual de embriões que atingem o estágio de mórula e os índices de desenvolvimento embrionário (MATSUI et al., 1995; AUGUSTIN et al., 2003).

Além disso, a insulina pode atuar benéficamente sobre o desenvolvimento embrionário e subsequente fertilidade. Estudos *in vitro* têm revelado que o desenvolvimento embrionário pode ser melhorado após a suplementação do meio de cultivo com insulina e IGF I (BYRNE et al., 2002; MAKAREVICH et al., 2002; SIRISATHIEN et al., 2003), visto que estes mediadores hormonais reduzem a apoptose celular (AUGUSTIN et al., 2003), bem como promovem um aumento da proliferação celular em blastocistos bovinos (BYRNE et al., 2002 ; MAKAREVICH et al., 2002).

Alguns estudos têm mostrado que a suplementação do meio de maturação com insulina melhora a expansão das células do *cumulus* e a capacidade do oócito em ser fecundado *in vitro* (LORENZO et al., 1994; WEBB et al., 1994).

2.7.1 Receptores

Os receptores para a insulina e IGF I possuem estruturas similares e afinidade cruzada (HEYNER et al., 1993). No entanto, a insulina possui um efeito metabólico mais potente do que o IGF I (HADLEY, 1988). Na foliculogênese, a insulina tem ação na manutenção e crescimento dos folículos primordiais e primários e, em baixas concentrações, pode aumentar os índices de formação de folículos primários (YU e ROY, 1999).

Para desencadear seus efeitos nas diversas células a insulina atua por meio da ligação com seus receptores de membrana (IR). O IR pertence a uma família de receptores de fatores de crescimento que têm atividade tirosina cinase intrínseca, na qual se incluem o IR e o IGF-IR. Após a ligação da

insulina com seu receptor, o mesmo sofre autofosforilação em múltiplos resíduos de tirosina. Isto resulta na ativação da cinase do receptor e consequente fosforilação em tirosina de uma família de substratos do receptor de insulina (IRS). As vias de sinalização decorrentes da ligação da insulina com seu receptor são complexas e nos mostram a diversidade de efeitos que esse hormônio pode gerar nas mais diferentes células do organismo (SALTIEL e KAHN, 2001; CARVALHEIRA et al., 2002). Entre esses efeitos estão incluídas a regulação da diferenciação, crescimento, sobrevivência e metabolismo celular (FANTL et al., 1993; CARVALHEIRA et al., 2002; KOKK et al., 2005).

3 HIPÓTESE

A coloração dos oócitos bovinos, graus I e II, pelo Azul Cresil Brilhante (ACB) ou Azul de Tripan (AT), favorece a seleção de oócitos mais competentes para a produção *in vitro* de embriões.

A adição de IGF I e/ou Insulina ao meio de maturação *in vitro* de oócitos, selecionados com auxílio de corantes vitais, incrementa as taxas de produção embrionária *in vitro* e a qualidade destes embriões.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar a taxa de produção embrionária *in vitro*, a partir de oócitos bovinos selecionados por coloração com Azul Cresil Brilhante (ACB) ou Azul de Tripán (AT) e maturados em meio suplementado com Insulina e/ou IGF I.

4.2 Específicos

Selecionar oócitos mais competentes para maturação *in vitro* pela coloração com ACB ou AT;

Verificar o efeito da suplementação do meio de maturação com IGF I e/ou insulina, sobre a taxa de produção embrionária;

Avaliar a qualidade e quantidade dos embriões produzidos *in vitro*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no período de Outubro 2012 a Janeiro de 2013, no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA).

Foram utilizados 155 ovários, obtidos de fêmeas bovinas abatidas em abatedouro de São Luís - MA, portanto em fase aleatória de ciclo estral. A coleta foi realizada logo após o abate e evisceração, e os ovários acondicionados em garrafa térmica contendo solução salina estéril a 0,9%, previamente aquecida à temperatura de 37 °C, e imediatamente enviados ao laboratório, em tempo não superior a 3 horas após o abate. No laboratório os ovários foram lavados 2 vezes em DMPBS acrescido de antibiótico (NUTRICELL[®]) à temperatura de 37 °C e mantidos posteriormente em banho-maria à mesma temperatura.

5.1 Obtenção dos oócitos

Os folículos entre 2 e 8 mm de diâmetro foram puncionados utilizando agulha 40x12 (19G) e seringa de 5 mL. O líquido aspirado foi acondicionado em tubo de 15 mL mantido em banho-maria por 10 minutos para sedimentação dos oócitos.

5.2 Procura e seleção morfológica

O sedimento com oócitos foi recuperado com auxílio de pipeta de Pauster e transferido para placa de petri, contendo DMPBS aquecido e líquido folicular, para procura e seleção dos oócitos, sob estereomicroscópio (Nova Optical System LBX - 20). Os oócitos encontrados foram transferidos para outra placa de petri, contendo DMPBS aquecido, com auxílio de micropipeta e então classificados morfológicamente.

Foram selecionados para coloração e posterior maturação, oócitos de grau I e II, segundo a classificação de Lonergan (1992), para os complexos *cumulus oophorus* (COCs).

5.3 Coloração dos COCs por Azul Cresil Brilhante (ACB) ou Azul de Tripán (AT)

Após a classificação morfológica foram selecionados 220 oócitos destes, 115 COCs foram submetidos à coloração com ACB a 26 µM (B-5388, Sigma, USA) diluído em DMPBS, a 38,5°C, 5% CO₂ e 90% de umidade (condição de incubação) durante 60 minutos. Ao término do período de exposição os COCs foram submetidos a três lavagens em solução de DMPBS e divididos em dois grupos de acordo com a coloração do citoplasma, ACB+ (citoplasma azulado), e ACB- (citoplasma incolor).

Os 105 COCs restantes foram submetidos à coloração por AT a 0,16% (C.L. 23850, VETEC, BRA) preparado em DMPBS, sob condição de incubação por 10 minutos. Ao término do período de exposição os COCs foram submetidos a três lavagens em solução de DMPBS e divididos em dois grupos de acordo com a coloração do citoplasma, AT+ (citoplasma azulado), e AT- (citoplasma incolor).

5.4 Grupos experimentais

Dos oócitos submetidos à coloração por ACB apenas os ACB+ foram utilizados no experimento, e subdivididos nos seguintes grupos experimentais para maturação *in vitro*, com adição de IGF I na concentração de 10ng/mL (I-3769, Sigma, USA) e/ou Insulina na concentração de 12 UI/mL (I-2643, Sigma, USA) e sem adição destes, conforme quadro abaixo:

Quadro 1: Grupos experimentais conforme suplementação do meio de maturação de oócitos submetidos a coloração por ACB.

Grupo	Composição do meio
G1	Meio de maturação (Controle)
G2	Meio de maturação + IGF I
G3	Meio de maturação + Insulina
G4	Meio de maturação + IGF I+ Insulina

Os oócitos corados pelo AT foram divididos de forma semelhante ao ACB, com adição de IGF I na concentração de 10ng/mL (I-3769, Sigma, USA) e/ou Insulina na concentração de 12 UI/mL (I-2643, Sigma, USA) e sem adição destes, porém foram utilizados nos grupos experimentais os oócitos corados e não corados (AT + e –, respectivamente).

Quadro 2: Grupos experimentais conforme suplementação do meio de maturação de oócitos submetidos a coloração por AT.

AT +	AT -
G1 – Meio de maturação	G5 – Meio de maturação
G2 – Meio de maturação + IGF I	G6 – Meio de maturação + IGF I
G3 – Meio de maturação + Insulina	G7 – Meio de maturação + Insulina
G4 - Meio de maturação + IGF I+ Insulina	G8 - Meio de maturação + IGF I + Insulina

5.5 Maturação oocitária

O meio de maturação foi constituído por meio de maturação Nutricell[®] acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB). Os grupos de oócitos foram submetidos à maturação *in vitro*, conforme quadro 1 e 2, em placa de petri contendo gotas de 150 µL de meio de maturação e recobertas com óleo mineral autoclavado, previamente equilibrado por no mínimo duas horas em

incubadora com 5% de CO₂ à temperatura de 38,5 °C e 90% de umidade. Os oócitos foram maturados nestas condições de temperatura e atmosfera durante 20 a 24 horas. Decorrido o processo de maturação os oócitos foram avaliados sob estereomicroscópio para verificar a expansão das células do *cumulus*.

5.6 Preparação espermática e Fecundação *in vitro*

Após a maturação, os oócitos foram submetidos a três passagens em meio de fecundação Nutricell[®], contendo 20µL de heparina (Nutricell[®]) e 30µL de PHE (penicilina, hipotaurina e epinefrina - Nutricell[®]). A preparação espermática foi obtida de um pool de sêmen congelado, de partida única e com motilidade mínima de 30% pós-descongelamento.

A separação espermática foi realizada em de gradiente descontínuo de *Percoll* (Nutricell[®]), consistindo em 2mL de *Percoll* à 90% e 2mL de *Percoll* à 45%, acondicionados em tubo cônico graduado de 15 mL, para posterior centrifugação dos espermatozoides à 700 g por 30 minutos, utilizando-se 500 µL de sêmen. Decorrido este período, o pellet formado foi transferido para outro tubo contendo 1000 µL de meio de fecundação acrescido de heparina e PHE (Nutricell[®]), na mesma concentração utilizada na lavagem dos oócitos, e centrifugado por 10 minutos à 700 g. Após o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 400 µL de meio de fecundação. Uma alíquota de 5 µL foi retirada e diluída em 45 µL de água para análise da concentração espermática em câmara de Neubauer e, cálculo da dose inseminante utilizada (2×10^6 espermatozoides/mL). Onde utilizaram-se os seguintes cálculos:

Concentração espermática = nº de espermatozoides contados x 10 x 10 x 1000 = nº sptz/mL.

Espermatozoides viáveis = nº sptz/mL x motilidade pós-descongelamento.

Fator de diluição = nº sptz viáveis : 150 (volume da gota).

Dose inseminante = 150 : fator de diluição.

A dose inseminante foi transferida para as gotas de meio de fecundação contendo os oócitos e mantidos em incubação por 18 horas nas mesmas condições utilizadas para a maturação *in vitro* (D-0).

5.7 Cultivo embrionário

Após a fecundação *in vitro*, as estruturas foram lavadas três vezes em SOF (Fluído Sintético de Oviduto - NUTRICELL[®]) acrescido de 5% de SFB (NUTRICELL[®]) e após transferidos para placa contendo gotas de 150 µL de SOF + 5% de SFB (Nutricell[®]), previamente estabilizadas por no mínimo 24 horas e recobertas com óleo mineral autoclavado. As estruturas foram cultivadas a uma temperatura de 38,5 °C, em atmosfera com 5% de CO₂ e umidade saturada por um período de 8 dias. Decorrido o tempo do cultivo *in vitro*, as estruturas foram avaliadas sob esteriomicroscópio, para avaliação da qualidade e quantidade das estruturas que chegaram a blastocistos (D-8).

5.8 Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, e todos os tratamentos realizados simultaneamente.

Para execução das análises estatísticas dos dados referentes aos oócitos corados por Azul Cresil Brilhante foi utilizado o procedimento PROC GLM (General Linear Model) do programa estatístico SAS[®], versão 9. Para todas as análises considerou-se nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

Aplicou-se, a seguir, o teste não-paramétrico exato de Fisher, pelo qual a frequência com que os oócitos submetidos apresentaram produção de blastocistos, além da qualidade desses blastocistos foram associadas aos tratamentos.

Para os oócitos corados pelo Azul de Tripán, os mesmos foram submetidos apenas a uma análise descritiva, devido ao número reduzido das unidades experimentais.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizados durante o experimento 220 oócitos graus I e II, onde deste total 115 oócitos foram submetidos à coloração por Azul Cresil Brilhante e 105 oócitos a coloração por Azul de Tripán.

Do total de oócitos submetidos à coloração por ACB, 92 (80%) foram classificados como azul cresil brilhante positivo (ACB +) com o citoplasma apresentando uma coloração azulada (Fig. 1), e 23 (20%) como azul cresil brilhante negativo (ACB -) apresentando o citoplasma incolor, após a exposição ao corante azul cresil brilhante em um tempo de incubação de 60 minutos.

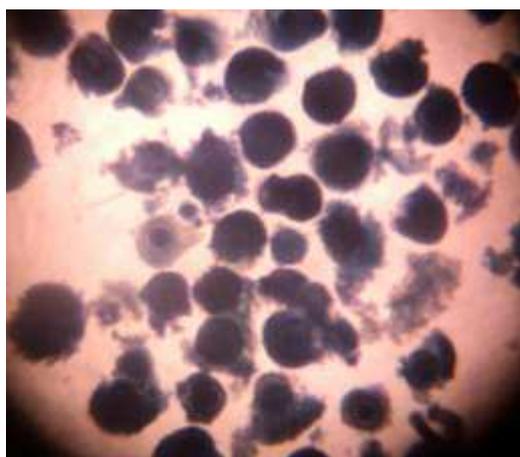


Figura 1: Oócitos corados por ACB, demonstrando o citoplasma azulado (ACB +)

Dos 105 oócitos expostos ao corante Azul de Tripán por um tempo de incubação de 10 minutos, 73 (69,52%) foram classificados como AT+, por apresentarem-se corados (Fig. 2) e 32 (30,48%) como AT- apresentando um citoplasma incolor (Fig. 3), quando da análise dos mesmos sob estereomicroscópio, após 3 lavagens em DMPBS (NUTRICELL®).

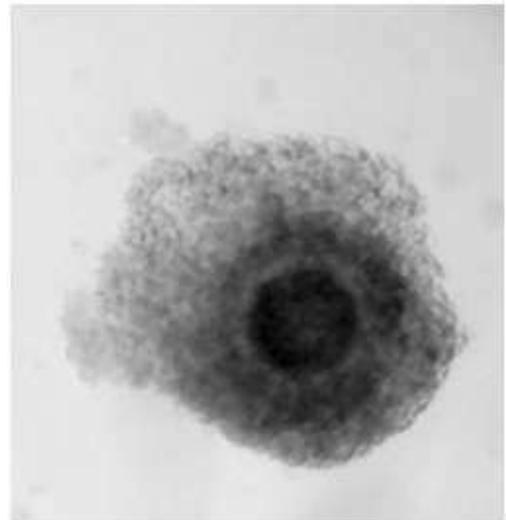
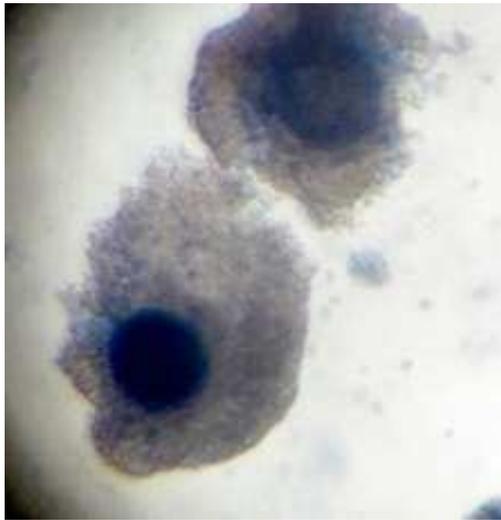


Figura 2: Oócitos corados por AT, apresentando – se corado em azul (AT +) **Figura 3:** Oócito não corado por AT, apresentando – se incolor (AT -)

Quanto à maturação oocitária, todos os oócitos ao estereomicroscópio apresentaram uma boa expansão das células do *cumulus* (Fig. 4), sugerindo que esta ocorreu em todos os tratamentos utilizados, mesmo nos grupos Azul Tripán +.

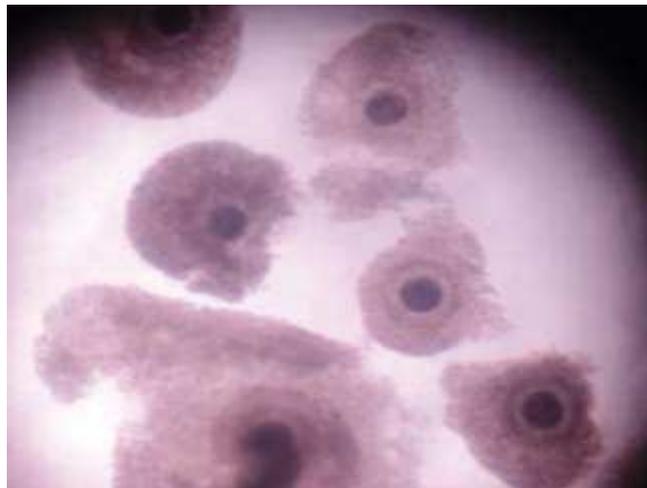


Figura 4: Oócitos apresentando expansão das células do *cumulus*, após o processo de maturação *in vitro*.

Segundo Avery et al. (2002) tal fato pode ser explicado, pela retomada imediata da meiose após a retirada do oócito do interior do folículo. Desta forma muitos oócitos em metáfase 2 não sofrerão adequadamente o processo de capacitação, não apresentando a mesma competência para continuar o desenvolvimento após a fecundação, em comparação aos oócitos maturados *in vivo*.

Os dados referentes à produção e qualidade dos blastocistos, correspondentes aos oócitos corados pelo ACB e submetidos à suplementação do meio de maturação, encontram-se dispostos na tabela 1.

Tabela 1: Desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos selecionados pela coloração Azul Cresil Brilhante (ACB+), no D8 do cultivo, e maturados em meio suplementado com IGF I (10 ng/ mL) e/ou Insulina (12UI/ mL). São Luis – MA, 2013.

	Grupos de tratamento			
	Controle	IGF I	Insulina	IGF I + Insulina
Total de oócitos	23	25	24	20
Blastocistos	(16) 69,56%	(19) 88%	(18) 91,67%	(19) 80%
Blastocistos graus I e II	(13) 69,56%	(14) 72%	(13) 83,33%	(14) 75%

Dados analisados pelo teste Exato de Fisher ($P > 0,05$).

No dia 8 do cultivo embrionário, pode-se observar na avaliação sob estereomicroscópio que o desenvolvimento embrionário foi bom em todos os grupos tratados, com presença de elevada taxa de produção de blastocistos. Notou-se um discreto aumento das taxas nos grupos que possuíam a presença de insulina como suplementação ao meio de maturação (Insulina e Insulina + IGF I), porém quando da análise estatística, não foi observada diferença significativa entre os diferentes tratamentos. Sugerindo desta forma que, a coloração por ACB foi capaz de selecionar os oócitos melhor desenvolvidos, apresentando um adequado desenvolvimento embrionário *in vitro*, após a

fecundação, não ocorrendo aumento da taxa de produção de embriões quando da suplementação do meio de maturação *in vitro*.

Wongsrikeao et al. (2006), trabalhando com oócitos de suínos observaram que a seleção de oócitos usando a coloração por ACB, melhorou as taxas de maturação nuclear, fecundação monospérmica e desenvolvimento embrionário subsequente, assim como uma melhoria da qualidade embrionária.

Apesar de não ter ocorrido diferença significativa, pode-se notar que houve um discreto aumento na produção de blastocistos e na qualidade destes nos grupos suplementados com IGF I e/ou insulina, em comparação ao grupo controle, tal fato pode ter ocorrido pelo potencial mitogênico e anti – apoptótico desempenhados pela insulina e IGF I.

A presença de IGF I ou insulina no meio de maturação acelera a progressão meiótica exercendo efeito positivo sobre as taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário, incrementando desta forma a produção de blastocistos. Favorecendo também as taxas de fecundação *in vitro* pelo efeito da insulina sobre as células do *cumulus* (HERRLER et al., 1992; MATSUI et al., 1995; BORTOLOTTO et al., 2001; SAKAGUCHI et al., 2002).

Quanto aos oócitos corados e não corados pelo Azul de Tripán (AT+ e AT-, respectivamente), os mesmos foram submetidos à maturação em meio suplementado com IGF I e/ou Insulina e após a FIV avaliados quanto à taxa de produção de blastocistos e qualidade destes (Tab. 2).

Tabela 2: Desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos selecionados pela coloração Azul de Tripán (AT+ e AT -), no D8 do cultivo, e maturados em meio suplementado com IGF I (10 ng/ mL) e/ou Insulina (12UI/ mL). São Luis – MA, 2013.

AT+	Grupos de tratamento			
	Controle +	IGF I	Insulina	IGF I + Insulina
Total de oócitos	16	26	14	17
Blastocistos	(11) 68,75%	(17) 65,38%	(12) 85,71%	(11) 64,7%
Blastocistos graus I e II	(11) 68,75%	(17) 65,38%	(10) 71,42%	(11) 64,7%
AT-	Controle -	IGF I	Insulina	IGF I + Insulina
Total de oócitos	5	4	9	10
Blastocistos	(5) 100%	(4) 100%	(7) 77,77%	(8) 80%
Blastocistos graus I e II	(3) 60%	(2) 50%	(7) 77,77%	(5) 50%

Dados submetidos à análise descritiva.

Todos os tratamentos apresentaram uma elevada taxa de clivagem, mesmo nos grupos de oócitos que coraram pelo Azul de Tripán. Courbiere et al. (2005), relataram que os oócitos inviáveis (mortos) apresentam o ooplasma de coloração azul escuro com células do *cumulus* translúcidas. Ressaltando ainda, que apesar da coloração por AT ser um método usual e rápido para predizer a qualidade e viabilidade dos folículos, este não proporciona um estudo ultraestrutural do oócito. Portanto, mesmo a membrana sendo lisada por um agente citotóxico, organelas citoplasmáticas podem ainda, manter sua atividade fisiológica (VALADARES et al., 2007).

Podemos atribuir desta forma, que os oócitos AT+ podem ter prosseguido o desenvolvimento embrionário *in vitro*, por apresentarem preservadas as estruturas intracitoplasmáticas, que permitiram sua adequada maturação, fecundação e clivagem até alcançar a fase de blastocisto, apesar da lesão de membrana que permitiu a passagem do corante.

Com a suplementação do meio de maturação com insulina, pode-se observar que ocorreu um aumento da taxa produção e na qualidade dos blastocistos oriundos dos oócitos AT+, e na qualidade dos blastocistos oriundos dos oócitos que não coraram (AT-), quando da exposição ao azul de tripan.

Resultado semelhante foi observado por Ocaña-Quero et al. (1998), que trabalhando com oócitos bovinos notou que com a suplementação do meio de maturação com insulina (bovina ou humana), levou a um aumento nas taxas de maturação *in vitro*, fecundação e clivagem, quando oócitos com *cumulus* intactos eram cultivados em meio de maturação definido acrescido de soro fetal bovino.

Augustin et al. (2003) observaram que além da insulina melhorar as taxas de clivagem e desenvolvimento de blastocistos, assim como o número total de células que atingiram essa fase, o principal efeito benéfico da suplementação de insulina no desenvolvimento do blastocisto *in vitro* é a redução nas taxas de apoptose.

7 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado o experimento, pode-se concluir que o corante Azul Cresil Brilhante é um método eficiente no auxílio à seleção de oócitos mais capacitados para a produção *in vitro* de embriões.

A coloração por Azul de Tripán, na concentração utilizada no experimento, não foi capaz de diferenciar oócitos vivos e mortos de forma adequada.

A adição de insulina e IGF I, nas concentrações testadas, não conferiram acréscimos muito acentuados à taxa de produção e qualidade dos blastocistos.

Referências

ADASHI, E.Y. The IGF family and folliculogenesis. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 39, p. 13-19, 1998.

ALM, H., TORNER, H., LÖHRKE, 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. 2194–205, 2005.

ARMSTRONG, D.T., XIA. P., GANNES, G., TEKPETEY, F. R., KHAMSI, F. Differential effects of insulin-like growth factor-I and follicle-stimulating hormone on proliferation and differentiation of bovine cumulus cells and granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v.54, p.331-338, 1996.

ARMSTRONG, D. G., GUTIERREZ, C. G., BAXTER, G., GLAZYRIN, A. L., MANN, G. E., WOAD, K. J., HOGG, C. O., WEBB, R. Expression of mRNA encoding IGF-I, IGF-II and type 1IGF receptor in bovine ovarian follicles. **Journal of Endocrinology**, v. 165, p. 101-113, 2000.

ARMSTRONG, D.G., GONG, J.G., GARDNER, J.O., BAXTER, G., HOGG, C.O., WEBB, R. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. **Reproduction**, v. 123, p. 371–378, 2002.

AUGUSTIN, R., POCAR, P., WRENZYCKI, C., NIEMANN, H., FISCHER, B. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced *in vitro*. **Reproduction**, v.126, n.1, p.91-99. 2003.

AVERY, B., FAERGE, I., HOLM, P. Confocal Microscopy of bovine opu oocytes and Roscovitine treated abattoir oocytes with emphasis on Mitochondria distribution and nuclear stage. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 711, 2002.

BASTOS, C. V., VASCONCELOS, M. M. C., RIBEIRO, M. F. B., PASSOS, L. M. F. Manutenção *in vitro* de células IDE8 em dois tipos de soro bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Vetererinária e Zootecnia**, v.59, n.2, p.543-546, 2007.

BLOCK, J., DROST, M., MONSON, R.L., RUTLEDGE, J.J., RIVERA, R.M., PAULA-LOPES, F.F., OCON, O.M., KRININGER, III C.E., LIU, J., HANSEN, P.J. Use of insulin-like growth factor-I during embryo culture and treatment of recipients with gonadotropin-releasing hormone to increase pregnancy rates following the transfer of *in vitro*-produced embryos to heat-stressed, lactating cows. **Journal of Animal Science**, v.81, p.1590-602, 2003.

BORINI, A., LAGALLA, C., CATTOLI, M., SERENI, E., SCIAJNO, R., FLAMIGNI, C., COTICCHIO, G. Predictive factors for embryo implantation potential. **Reproduction BioMedicine Online**, v. 10, p. 653– 68, 2005.

BORTOLOTTO, E. B., GONÇALVES, P. B. D., NEVES, J. P., COSTA, L. F. S., MACIEL, M. N., MONTAGNER, M. M., FARIAS, A. M., STRANIERI, P. Fator de crescimento derivado das plaquetas, retinol e insulina na regulação da maturação nuclear de oócitos bovinos e suas consequências no desenvolvimento embrionário. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, p. 1-7. 2001.

BYRNE, A.T., SOUTHGATE, J., BRISON, D.R., LEESE, H.J. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. **Molecular Reproduction and Development**, v.62, p.489-95, 2002.

CAMARGO, L. S. A., VIANA, J. H. M., SÁ, W. F., FERREIRA, A. M., RAMOS, A. A., VALE FILHO, V. R. Factors influencing *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction**, v. 3, p. 19 - 28, 2006.

CARVALHEIRA, J.B.C., ZECCHIN, H.G., SAAD, M.J.A. Vias de sinalização da insulina. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 46, n.4, p. 419 – 425, 2002.

CETICA P., PINTOS, L., DALVIT, G., BECONI, M. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation *in vitro*. **Reproduction**, v. 124, p. 675–681. 2002.

CÓRDOVA, B., MORATÓ, R., FRUTOS, C., BERMEJO-ÁLVAREZ, P., PARAMIO, T., GUTIÉRREZ-ADÁN, A., MOGAS, T. Effect of leptin during *in vitro* maturation of prepubertal calf oocytes: Embryonic development and relative mRNA abundances of genes involved in apoptosis and oocyte competence. **Theriogenology**, v. 76, p. 1706–1715, 2011.

COURBIERE, B., MASSARDIER, J., SALLE, B., MAZOYER, C., GUERIN, JF., LORNAGE, J. Assessment after cryopreservation of whole sheep ovaries with vascular pedicle by vitrification. **Fertility and Sterility**, v. 84, Suppl. 2, p. 1065-1071, 2005.

DALLE, S., RICKETTS, W., IMAMURA, T., VOLLENWEIDER, P., OLEFSKY, J. M. Insulin and insulin-like growth factor I receptors utilize different G protein signaling components. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 15688 – 15695, 2001.

DAUGHADAY, W.H., ROTWEIN, P. Insulin- like growth factors I and II. Peptides, messenger ribonucleic acids and gene structures, serum and tissue concentration. **Endocrine Reviews**, v. 10, p. 68 – 92, 1989.

DE LOOS, F. A. M., VAN BENEDEN, T., KRUIP, T. A. M., VAN MAURIK, P. Structural aspects of bovine oocyte maturation *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v.31, n. 3, p.208-214, 1992.

DIB, E., RODRIGUES, E. B., MAIA, M., MEYER, C. H., PENHA, F. M., FURLANI, B. A., COSTA, E. P. F., FARAH, M. E. Corantes vitais em cromovitrectomia. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v.72, n. 6, p. 845-50, 2009.

DISKIN, M.G., MACKEY, D.R., ROCHE, J.F., SREENAN J.M. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 345-370, 2003.

EBNER, T., MOSER, M., SOMMERGRUBER, M., TEWS, G. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. **Human Reproduction Update**, v. 9, p. 251–62, 2003.

FABIAN, D., IL'KOVÁ, G., REHÁK, P., CZIKKOVÁ, S., BARAN, V., KOPPEL, J. Inhibitory effect of IGF-I on induced apoptosis in mouse preimplantation embryos cultured *in vitro*. **Theriogenology**, v.61, p.745-55, 2004.

FAGBOHUN, C. E.; DOWNS, S.M. Metabolic coupling and ligand stimulated meiotic maturation in the mouse oocyte-cumulus cell complex. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 851-859, 1991.

FANTL, W.J., JOHNSON, D.E., WILLIAMS, L.T. Signalling by receptor tyrosine kinases. **Annual Reviews of biochemistry**, v. 62, p. 453-481, 1993.

FATEHI, A. N., ROELEN, B. A. J., COLENBRANDER, B., SCHOEVERS, E. J., GADELLA, B. M., BEVERS, M. M., VAN DEN HURK, R. Presence of cumulus cells during in vitro fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. **Zygote**, v. 13, n. 2, p. 177-185, 2005.

FERNANDES, V.C., ENADAI, A. A.M.L., MILLÁN, R.D.S., ALVES. R.J., JÚNIOR, A.S.C. Caracterização físico-química de complexos de insulina: dimetil – β – ciclodextrina e insulina: hidroxilpropil – β – ciclodextrina e avaliação da influência do tipo de complexo na produção de microesferas biodegradáveis. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**, v.43, n. 4, p. 544- 553, 2007.

FEUGANG, J. M., CAMARGO-RODRÍGUEZ, O., MEMILI, E. Culture systems for bovine embryos. **Livestock Science**, v. 121, n. 2 , p. 141-149, 2009.

FILIPIAK, Y., LAROCCA, C. Utilización del azul tripán para diferenciar ovócitos bovinos vivos y muertos en fertilización *in vitro*. **Archivos de Zootecnia**, v. 61, n. 234, p. 309-312, 2012.

FLESH, F. M., GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1469, p.197 - 235, 2000.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 2, p. 225-232, 1994.

FORTUNE, J. E., CUSHMAN, R. A., WAHL, C. M., KITO, S. The primordial to primary follicle transition. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Ireland, v. 163, n. 1, p. 53-60, 2000.

FORTUNE, J.E., RIVERA, G.M., YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.109-126, 2004.

GILCHRIST, R.B., RITTER, L.J., ARMSTRONG, D.T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 431-446, 2004.

GINTHER, O.J., BERGFELT, D. R., BEG, M. A., KOT, K. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.124, p.475-482, 2002.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; DONADEU, F.X. BERGFELT, D.R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**. v.78, p.239-257, 2003.

GINTHER, O. J., BERGFELT, D. R., BEG, M. A., MEIRA, C., KOT, K. In vivo effects of an intrafollicular injection of insulin-like growth factor 1 on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 99 – 105. 2004.

GONÇALVES, P.B.D., FIGUEIREDO, J.R., FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**, São Paulo: Livraria Varela, p. 6 – 10 , 2002.

GORDON, I. Recovering the bovine oocyte. **Laboratory production of cattle embryos**. ed. 2, p. 79-111, 2003.

GUPTA, P. S. P., NANDI, S., RAVINDRANATHA, B. M., SARMA, P. V. Trypan blue staining to differentiate live and dead buffalo oocytes and its effect on embryo development in vitro. **Buffalo Journal**, v. 18, p. 321-330. 2002.

GUTIERREZ, 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.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A., OTER, M., MARTÍNEZ-MADRID, B., PINTADO, B., DE LA FUENTE, J. Differential expression of two genes located on the x chromosome between male and female in vitro produced bovine embryos at the blastocyst stage. **Molecular Reproduction and Development**, v.55, p.146-151, 2000.

HADLEY, M.C. Growth hormones. **Endocrinology**, ed. 2, Cap.12, p.266-298, 1988.

HARPER, K.M., BRACKETT, B.G. Bovine blastocyst development after follicle-stimulating hormone and platelet-derived growth factor treatment for oocyte maturation *in vitro*. **Zygote**, v.1, p.27-34, 1993.

HASTIE, P.M., HARESIGN W. A role for LH in the regulation of expression of mRNAs encoding components of the insulin-like growth factor (IGF) system in the ovine corpus luteum. **Animal Reproduction Science**. v. 96, p. 196-209, 2006.

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

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.1302-10, 1998.

HEYNER, S., SHI, C., GARSIDE, W. T., SMITH, R. M. Functions of the IGFs in early mammalian development. **Molecular Reproduction Development**, v.35, p.421- 426, 1993.

ITOH, T., KACCHI, M., ABE, H., SENDAI, Y., HOSHI, H. Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. **Biology of Reproduction**, v.67, p.1099-105, 2002.

JEWGENOW, K., STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats - viability and ultrastructural investigations. **Reproduction Domestic Animals**, v. 44, p. 183-193, 1996.

JOUSAN, F.D., HANSEN, P.J. Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1665-1650, 2004.

KATO, K., TSUNODA Y. Low temperature preservation of mouse fetal germ cells at 4°C. **Theriogenology**. v. 45, p. 1029-1035. 1996.

KOKK, K., VERÄJÄNKORVA, E., LAATO, M., WU, X. K., TAPPER, H., PÖLLÄNEN, P. Expression of insulin receptor substrates 1-3, glucose transporters GLUT – 1-4, signal regulatory protein1 α , phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B at the protein level in the human testis. **Anatomical Science International**, v. 80, p. 91-96, 2005.

KRISHER, R.L., BRAD, A. M., HERRICK, J.R., SPARMAN, M.L., SWAIN, J.E. A comparative analysis of metabolism and viability in porcine oocytes during *in vitro* maturation. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p.72-96, 2007.

LADISCH, M.R., KOHLMANN, K.L. Recombinant human insulin. **Biotechnology Progress**, v.8, p. 469-478, 1992.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. ed. 2, São Paulo, 1995.

LeROITH, D., WERNER, H., BEITNER-JOHNSON, D., ROBERTS, C. T. Jr. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. **Endocrine Reviews**, v. 16, p. 143-163, 1995.

LEWIN, A., TAL, Z., ZOHAV, E., SCHENKER, J. G. Ultrarapid freezing and thawing of hamster oocytes. Morphologic parameters, trypan blue staining and sperm penetration assay for evaluating survival. **Journal of Reproductive Medicine**, Feb, v. 35, n. 2, p. 136-40. 1990.

LIGHTEN, A.D., MOORE, G.E., WINSTON, R.M.L., HARDY, K. Routine addition of human insulin-like growth factor-1 ligand could benefit clinical *in vitro* fertilization culture. **Human Reproduction**, v. 13, p. 3144–50, 1998.

LIN, T.C., YEN, J.M., GONG, K.B., HSU, T.T., CHEN, L.R. IGF-1/IGFBP-1 increases blastocyst formation and total blastocyst cell number in mouse embryo culture and facilitates the establishment of a stem-cell line. **BMC Cell Biology**, v.4, p.14, 2003.

LONERGAN, P. Studies in the *in vitro* maturation, fertilization and culture of bovine follicular oocytes. 157f. **Thesis** (PhD). National University of Ireland, Dublin. 1992.

LONERGAN, P., CAROLAN, C., VAN LANGENDONCKT, A., DONNAY, I., KHATIR, H., MERMILLO, P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.54, p.1420-9, 1996.

LONERGAN, P., GUTIÉRREZ-ADÁN, A., PINTADO, B., FAIR, T., WARD, F., FUENTE, J. D., BOLAND, M. Relationship between time of first cleavage and expression of IGF_I growth factor, its receptors and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 57, p. 146-152, 2000.

LONERGAN, P., FAIR, T. In vitro-produced bovine embryos - Dealing with the warts. **Theriogenology**, v.69, p.17-22, 2008.

LORENZO, P.L., ILLERA, M.J., ILLERA, J.C., ILLERA, M. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation in vitro by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, p.697-701, 1994.

LOUHIO, H., HOVATTA, O., SJOBERG, J., TUURI, T. The effects of insulin, and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. **Molecular Human Reproduction**, v.6, p.694-8, 2000.

MACHADO, M. A. Efeito do fator de crescimento igf-i sobre a maturação *in vitro* de oócitos caninos (*Canis familiaris*): avaliação da maturação nuclear e citoplasmática. Jaboticabal, 2007. 76f. **Tese** (Doutorado), Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", São Paulo, 2007.

MACIEL, Maria Aparecida M. et al . Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, Maio 2002. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000300016&lng=en&nrm=iso>. acesso em 22 de Abril de 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000300016>.

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.

MAKAREVICH, A.V., MARKKULA, M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during *in vitro* maturation and culture. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 386–92, 2002.

MAMLUK, R., GREBER, Y., MEIDAN, R. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid expression for steroidogenic factor-1, steroidogenic acute regulatory protein, and cytochrome P450 sidechain cleavage in bovine luteal cells. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 628–634, 1999.

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. **Development Biology**, v. 45, p. 211–20, 1975.

MARTINELLI JR, C. E., CUSTÓDIO, R. J., AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. Fisiologia do Eixo GH-Sistema IGF. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 52, p. 717-725, 2008.

MATSUI, M., TAKAHASHI, Y., HISHINUMA, M., KANAGAWA, H. Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulate the development of bovine embryos fertilized *in vitro*. **The Journal of veterinary medical science**, v.57, p.1109, 1995.

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

MOHSENI-ZADEH, S., BINOUX, M. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 interacts with the type 1 IGF receptor, reducing the affinity of the receptor for its ligands: an alternative mechanism in the regulatory of IGF action. **Endocrinology**, v. 138, p. 5645-5648, 1997.

MONGET, P., FABRE, S., MULSANT, P., LECERF, F., ELSÉN, J.M., MAZERBOURG. S., PISSELET, C., MONNIAUX, D. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 23, p. 139-154, 2002.

MOREIRA, F., PAULA-LOPES, F. F., HANSEN, P. J., BADINGA, L., THATCHER, W. W. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of *in vitro* derived bovine embryos. **Theriogenology**, v.57, p. 895-907, 2002.

NILSSON, E., PARROT, J.A., SKINNER, M.K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v.175, p.123-130, 2001.

NUTTINCK, F., CHARPIGNY, G., MERMILLOD, P., LOOSFELT, H., MEDURI, G., FRERET, S., GRIMARD, B., HEYMAN, Y. Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus-oocyte complexes during oocyte maturation. **Domestic Animal Endocrinology**, v.27, p.179-195, 2004.

OCAÑA-QUERO, J. M., PINEDO-MERLÍN, M., ORTEGA-MARISCAL, M., MORENO-MILLÁN, Y. M. Influence of human and bovine insulin on *in vitro* Maturation, fertilization and cleavage rates of bovine oocytes. **Archivos de Zootecnia**, v. 47, n. 177, p. 85-93. 1998.

ODLE, J., ZIJLSTRA, R. T., DONOVAN, S. M. Intestinal effects of milkborne growth factors in neonates of agricultural importance. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 2509 – 2522, 1996.

OLIVEIRA, J. C., SIVIERO-MIACHON, A. A., SPINOLA-CASTRO, A. M., BELANGERO, V. M. S., GUERRA-JUNIOR, GIL. Baixa estatura na doença renal crônica: fisiopatologia e tratamento com hormônio de crescimento. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 52, p. 783-791, 2008.

PALMA, G.A., MÜLLER, 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.347-53, 1997.

PAWLAK, P., RENSKA, N., PERS-KAMCZYC, E., WARZYCH, E., LECHNIAK, D. The quality of porcine oocytes is affected by sexual maturity of the donor gilt. **Reproductive Biology**, v. 11, p. 1–18, 2011.

PRELLE, K., STOJKOVIC, M., BOXHAMMER, K., MOTLIK, J., EWALD, D., ARNOLD, G.J., WOLF, E. Insulin-like growth factor I (IGF-I) and long R(3)IGF-I differently affect development and messenger ribonucleic acid abundance for IGF-binding proteins and type I IGF receptors *in vitro* produced bovine embryos. **Endocrinology**, v.142, p.1309-16, 2001.

PUJOL, M., BÉJAR-LOPES, M., PARAMIO, M.T. Developmental competence of heifers oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. **Theriogenology**, v. 61, p. 735 – 744, 2004.

RIVERA, G.M., CHANDRASEKHER, Y. A., EVANS, A. C. O., GIUDICE, L. C., FORTUNE, J. E. A potential role for insulin-like growth factor binding protein-4 proteolysis in the establishment of ovarian follicular dominance in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 102 – 111, 2001.

ROGA, J., MARTINEZ, E., VAZQUES, J. M., LUCAS, X. Selection of immature pig oocytes for homologous in vitro penetration assays with brilliant cresyl blue test. **Reproduction Fertility Development**, v. 10, p. 479 – 485, 1998.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, E., LOPEZ-BEJAR, M. VELILLA E., PARAMIO MT. Selection of prepubertad goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. **Theriogenology**, v. 57, p. 1397-1409, 2002.

RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca anatomica**, v. 24, p. 77-92, 1983.

RUSSELL, D. F., BAQIR, S., BORDIGNON, J., BETTS, D. H. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 1255–1270, 2006.

SADEU, J.C., CORTVRINDT, R., RON-EL, R., KASTERTEIN, E., SMITZ, J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured froze-thawed human fetal ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v.85, n.1, p.1130-1141, 2006.

SAKAGUCHI, M., DOMINKO, T., YAMAUCHI, N., LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., NAGAI, T., FIRST, N.L. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors in vitro. **Reproduction**, v.123, p.135-42, 2002.

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

SHOURBAGY, 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.

SIRISATHIEN, S., BRACKETT, B.G. TUNEL analyses of bovine blastocysts after culture with EGF and IGF-I. **Molecular Reproduction Development**, v.62, p.51-56, 2003.

SIRISATHIEN, S., HERNANDEZ-FONSECA, H.J., BRACKETT, B.G. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 77, p. 21– 32, 2003.

SIROTKIN, A.V., DUKESOVA, J., MAKAREVICH, A.V., KUBEK, A., BULLA, J. Evidence that growth factors IGF-I, IGF-II and EGF can stimulate nuclear maturation of porcine oocytes via intracellular protein kinase A. **Reproduction Nutrition Development**, v.40, p.559-69, 2000.

SPIKES, J. D. Photochemotherapy: molecular and processes involved. **SPIE Advances in Photochemotherapy**. V. 997, p. 92-100. 1998.

STEFANELLO, J. R., BARRETA, M. H., PORCIUNCULA, P. M., ARRUDA, J. N., OLIVEIRA, J. F., OLIVEIRA, M. A., GONÇALVES, P. B. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. **Theriogenology**. v. 66, p. 2068–2076, 2006.

STEWART, R.E., SPICER, L.J., HAMILTON, T.D., KEEFER, B.E. Effects of insulin-like growth factor I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine thecal 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.

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

SUTTON-MCDOWALL, MELANIE L., GILCHRIST, ROBERT B., THOMPSON ,J.G. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. **Reproduction**, v. 139, p. 685–695, 2010.

SUZUKI, H., SAITO, Y., KAGAWA, N., YANG, X. In vitro fertilization and polyspermy in the pig: factors affecting fertilization rates and cytoskeletal reorganization of the oocyte. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, p. 327–34, 2003.

TRENKLE, A. Radioimmunoassay of plasma hormone: review of plasma insulin in ruminants. **Journal of Dairy Science**, n. 55, v. 8, p. 1200-1211, 1972.

VALADARES, M. C., CASTRO, N. C., CUNHA, L. C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 4, out./dez., 2007.

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

VASSENA, R., MAPLETOFT R. J., ALLODI S., SINGH J., ADAMS G. P. Developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. **Theriogenology**, v. 15, p. 923-32, 2003.

WALTERS, K.A., BINNIE, J.P., CAMPBELL, B.K., ARMSTRONG, D.G., TELFER, E.E. The effects of IGF-I on bovine follicle development and IGFBP-2 expression are dose and stage dependent. **Reproduction.**, v.131, p.515-23, 2006.

WANG, Q., SUN, Q.Y. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. **Reproduction Fertility Development**, v. 19, p. 1–12, 2007.

WEBB, R., GONG, J.G., BRAMLEY, T.A. Role of growth hormone and intrafollicular peptides in follicle development in cattle. **Theriogenology**, v. 41, n. 1, p. 25–30 1994.

WERNER, H., BAXH, M. A., STANNARD, B., ROBERTS, C.T., LeROITH, D. Structural and functional analysis of the insulin-like growth factor I receptor gene promotes. **Molecular Endocrinology**, v. 6, p. 1545 – 1558, 1992.

WILSON, H. R., WARNICK, A. C., GUTIERREZ, J. H. Differentiation of live from dead spermatozoa in cock semen. **Poultry Science**, v. 48, p. 714 – 717, 1969.
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, 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. 722–31, 2007.

YOSHIMURA, Y. Insulin-like growth factors and their binding proteins – potential relevance to reproductive physiology. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 2, p. 1-24, 2003.

YU, N., ROY, S. Developmental of primordial and prenatal follicles from undifferentiated somatic cells and oocytes in the hamster prenatal ovary in vitro: Effect of insulin. **Biology Reproduction**, v.61, p.1558-1567, 1999.

ZHAO, J., TAVERNE, M.A., VAN DER WEIJDEN, G.C., BEVERS, M.M., VAN DEN, H.R. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates the development of cultured rat pre-antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v.58, p.287-96, 2001.