

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

**OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE PRODUÇÃO *IN VITRO* DE
EMBRIÕES CAPRINOS UTILIZANDO RETINÓIDES E FATOR
DE CRESCIMENTO**

JULIANA COSTA DA CONCEIÇÃO

**TESE DE DOUTORADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

RECIFE - PE

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

JULIANA COSTA DA CONCEIÇÃO

**OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE PRODUÇÃO *IN VITRO* DE
EMBRIÕES CAPRINOS UTILIZANDO RETINÓIDES E FATOR
DE CRESCIMENTO**

TESE DE DOUTORADO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de **DOUTOR** em Ciência Veterinária.

RECIFE – PE
2011

Ficha catalográfica

C744o Conceição, Juliana Costa da
Otimização do sistema de produção in vitro de embriões
caprinos utilizando retinóides e fator de crescimento /
Juliana Costa da Conceição. -- 2011.
103 f. : il.

Orientador: Marcos Antonio Lemos de Oliveira.
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento
de Medicina Veterinária, Recife, 2011.
Referências.

1. Reprodução animal 2. Retinol 3. Ácido retinóico
4. IGF-I 5. MIV 6. FIV 7. Blastocisto I. Oliveira, Marcos
Antonio Lemos de, Orientador II. Título.

CDD 636.08926

DEDICO

À minha mãe (minha alma gêmea) e meus irmãos Celso, Patrícia e Juliano pelo amor, incentivo e apoio constante em tudo que faço e realizo na minha vida. Amo vocês.

**Ao meu pai Celso Zuppi (in memória)
que onde estiver sei que está orgulhoso de mim.
Dedico a você, pai querido, a realização de mais
este sonho. Saudades eternas.**

AGRADECIMENTOS

A DEUS, que sempre está comigo em todos os momentos da vida, orientando meu caminho e me iluminando.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, por permitir a aquisição de conhecimentos e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária dessa Universidade pelo apoio constante.

Ao meu querido professor e orientador, Doutor Marcos Antonio Lemos de Oliveira por quem eu tenho muito respeito, admiração e carinho. Agradeço imensamente esta pessoa tão especial que Deus colocou na minha vida por toda oportunidade na realização desse estudo, auxílio constante e incondicional dedicado a mim.

Ao professor, Doutor Paulo Fernandes de Lima, pela amizade, carinho e oportunidade através de seus importantes ensinamentos durante o curso.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, pelo apoio na realização desta pesquisa.

Aos amigos que sempre me ajudaram e me apoiaram para a realização desta conquista, Joubert, Eduardo, Cristiano, Monteiro, Leopoldo, Edinho e Ricardo.

Aos meus familiares e amigos que sempre vibraram com cada conquista de minha vida. Amo vocês.

SUMÁRIO

		Página
AGRADECIMENTOS.....		v
SUMÁRIO.....		vi
LISTA DE TABELAS.....		Vii
LISTA DE FIGURAS		viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....		Ix
RESUMO.....		xii
ABSTRACT.....		xiv
1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1	Oogênese.....	6
2.2	Maturação <i>in vitro</i> de oócitos.....	8
2.3	Função das células do <i>cumulus oophurus</i> na maturação.....	9
2.4	Seleção dos folículos e dos oócitos.....	10
2.5	Meios e condições de cultivo	12
2.5.1	Adição de vitaminas aos meios de cultura de oócitos	15
2.5.2	Apoptose como mecanismo de morte celular	20
2.6	Avaliação da maturação.....	22
3.0	Fecundação <i>in vitro</i>	23
3.1	Desenvolvimento embrionário.....	28
3.1.1	Adição de vitaminas ao meio de desenvolvimento embrionário	31
3.1.2	Adição de fatores de crescimento ao meio de desenvolvimento embrionário.....	34
3.2	Avaliação da Fecunção <i>in vitro</i>	37
4	REFERÊNCIAS.....	38
5	CAPÍTULO I	67
6	CAPÍTULO II.....	86

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2: 86

Tabela 1: Média e desvio padrão ($\bar{x} \pm s$) de blastocistos caprinos previamente tratados com retinol (RT) e ácido retinóico (AR) na maturação *in vitro* de oócitos, bem como com retinol (RT), ácido retinóico (AR) e fator de crescimento (IGF-I) na co-cultura *in vitro* com monocamada de células de oviduto (MCO).....96

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1		67
Figura 1	Média e desvio padrão de oócitos caprinos positivos para atividade de enzimas caspases. Letras iguais nas diferentes colunas significam que não existiu diferença estatística ($P > 0,05$)	77
Figura 2	Média e desvio padrão de oócitos caprinos TUNEL-positivo. Letras desiguais nas diferentes colunas significam diferença estatística ($P < 0,05$)	78
Figura 3	Média e desvio padrão de blastocistos caprinos TUNEL-positivo. Letras desiguais nas diferentes colunas significam diferença ($P < 0,05$)	78
Figura 4:	Valores Médios ($\bar{x} \pm s$) dos embriões clivados no 3 ^o dia do co-cultivo <i>in vitro</i> . Letras desiguais nas diferentes colunas significam diferença ($P < 0,05$)	79
Figura 5:	Valores Médios ($\bar{x} \pm s$) dos embriões que alcançaram o estágio de blastocisto no 8 ^o dia do co-cultivo <i>in vitro</i> . Letras desiguais nas diferentes colunas significam diferença ($P < 0,05$)	80
Capítulo 2		86
Figura 1:	Média e desvio padrão de blastocistos caprinos TUNEL-positivo. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais	97
Figura 2:	Média e desvio padrão de blastocistos caprinos TUNEL-positivo. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais	97

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Adenosina Monofosfato
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclica
AR	Ácido Retinóico
ATP	Adenosina Trifosfato
bMM	Meio Básico de Maturação
BSA	Albumina Sérica Bovina
CCO	Complexo Cumulus Oócito
CGP	Células Germinativas Primordiais
CRABP	Proteína Ligadora de Ácido Retinóico na Célula
CRBP	Proteína Ligadora de Retinol na Célula
CR1	Meio de Cultivo Suplementado com BSA
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
E2	Estradiol
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
ES	Células-Tronco Embrionárias
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GH	Hormônio de Crescimento
hCG	Gonadotropina Coriônica Humana
HEPES	N-2-Hydroxythypiperazine-N'-2-ethanesulfonic acide
IGF	Fator de Crescimento com Ação Semelhante à Insulina
IGF-I	Fator I de Crescimento com Ação Semelhante à Insulina
IGF-II	Fator II de Crescimento com Ação Semelhante à Insulina
IGFBP	Proteínas de Ligação com IGF
IL	Interleucina
I-LH	Hormônio Luteinizante Marcado com Iodo
IRS	Substrato do Receptor de Insulina
KSOM	Meio de Cultivo Simples Otimizado com Potássio
LH	Hormônio Luteinizante

LIF	Fator Inibidor da Leucina
M II	Metáfase II
MAP	Proteínas Ativadas por Mitógenos
MAPK	Via da Proteínquinase Ativada por Mitógeno
MCI	Massa Celular Interna
COM	Monocamada de Células Epiteliais de Oviduto
mDM	Meio Definido Modificado
MDPK	Madin and Derby Bovine Kidney
MEM	Meio Mínimo Essencial
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
MPF	Fator Promotor da Maturação
NAC	N-acetil-cisteína
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
Ng	Nanograma
nM	Nanomolar
OMI	Inibidor da Maturação de Oócitos
P4	Progesterona
Pg	Picograma
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PVA	Álcool Polivinílico
RAR	Receptor Nuclear para o Ácido Retinóico
RBP	Proteína de Ligação de Retinol
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA _m	Ácido Ribonucléico Mensageiro
RT	Retinol
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase por Retro Transcrição
RU486	Substância com Ação Antiprogesterona
RXR	Receptor Nuclear para o 9- <i>cis</i> -Ácido Retinóico
SFB	Soro Fetal Bovino
SOD	Superóxido-dismutase

SOF	Fluido Sintético de Oviduto
SOFaa	Fluido Sintético de Oviduto com Aminoácidos
SVE	Soro de Vaca em Estro
TALP	Pyruvate Lactate Albumin Tyrodes
TCM	Meio para Cultura de Tecido
TGF α	Fator α de Crescimento Transformador
UI	Unidade Internacional
VGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
Mg	Micrograma
Mm	Micromolar
GC	Grupo Controle
GRT	Grupo Retinol
GAR	Grupo Ácido Retinóico

Título: Otimização do sistema de produção *in vitro* de embriões caprinos utilizando retinóides e fator de crescimento

Autor: Juliana Costa da Conceição

Orientador: Marcos Antonio Lemos de Oliveira

RESUMO

O objetivo deste estudo, dividido em dois experimentos, foi avaliar o efeito benéfico dos retinóides (retinol – RT; ácido retinóico – AR) e do fator de crescimento (IGF-I) na produção *in vitro* de embriões caprinos, bem como avaliar a apoptose através da atividade das enzimas caspases do grupo II e da fragmentação de DNA pelo teste de TUNEL. No primeiro experimento, dividido em três grupos (GC, GRT e GAR), foi avaliado a apoptose de oócitos e embriões caprinos submetidos à maturação *in vitro* em meio de cultivo contendo ou não RT e AR. O segundo experimento foi dividido em dois tratamentos, sendo no primeiro tratamento foi investigada a eficiência de ambos os retinóides nos oócitos distribuídos em meio TCM 199, e no segundo tratamento foi investigado a eficácia do RT, AR ou IGF-I dos zigotos em meio KSOM utilizando-se os mesmos meios em conjunto com a monocamada de células de oviduto (MCO). Um total 4320 oócitos-cumulus-complexo obtidos por aspiração de folículos (2-6 mm de diâmetro) ovarianos de animais abatidos em matadouro foram selecionados para MIV e incubados em TCM 199 a temperatura de 39° C em ar com 5% de CO₂ durante 24 horas. Ao final deste período, os oócitos foram processados em meio mDM e expostos aos espermatozóides por 18 horas. Os presumíveis zigotos foram depositados em gotas do meio KSOM enriquecidos com RT, AR ou IGF-I. Ao final do 10º dia da co-cultura os blastocistos foram preparados para a localização das alterações características da

apoptose utilizando-se o reagente PhiPhiLux-G1D2 e as soluções de paraformaldeído a 4% e de *Phosphate-Buffered Saline* + 1 mg/mL de *Polivinilpirrolidona*. No primeiro experimento, a atividade das enzimas caspases não diferiu ($P > 0,05$) entre os oócitos do GC (10,32%), do GRT (8,08%) e do GAR (8,45%), bem como entre a do GRT e do GAR. Os oócitos e blastocistos positivos para o teste de TUNEL foram maiores ($P < 0,05$), respectivamente, no GC (11,46%; 9,22%) do que no GRT (6,86%; 5,45%) e no GAR (7,41%; 6,12%), não existindo diferença ($P > 0,05$) entre os do GRT e do GAR. Os zigotos do GC apresentaram menor ($P < 0,05$) capacidade de desenvolvimento até o estágio de blastocito ($5,32 \pm 0,81$) do que aqueles dos GRT ($7,94 \pm 0,93$) e GAR ($7,36 \pm 1,02$), não existindo diferença ($P > 0,05$) entre os do GRT e do GAR. Já no segundo experimento, os resultados mostraram que os grupos de oócitos e embriões tratados somente com retinóides produziram menos blastocistos ($P < 0,05$) do que nos grupos de oócitos e embriões tratados com retinóides associados ao IGF-I. Quanto aos blastocistos positivos para apoptose, seja avaliada pela atividade das enzimas caspases ou pela fragmentação do DNA, não foi verificada diferença ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais. Conclui-se que a adição de retinóides ao meio de maturação de oócitos diminui a atividade apoptótica celular e a associação dos retinóides com o IGF-I é benéfica e pode ser recomendada para aumentar a produção *in vitro* de embriões da espécie caprina.

Palavras-chave: retinol, ácido retinóico, IGF-I, MIV, FIV, blastocisto.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA
Tese de Doutorado em Ciência Veterinária
Recife, Julho, 2011.

Title: Optimization of the production system in vitro embryo goats using retinoids and growth factor

Author: Juliana Costa da Conceição

Advisor: Marcos Antonio Lemos de Oliveira

ABSTRACT

The aim of this study, divided into two trials was to evaluate the beneficial effect of retinoids (retinol - RT; retinoic acid - RA) and growth factor (IGF-I) on in vitro production of goat embryos, and to evaluate apoptosis through the activity of enzymes of group II caspases and DNA fragmentation by TUNEL assay. In the first experiment, divided into three groups (CG, GRT and GAR), was evaluated apoptosis of goat oocytes and embryos undergo maturation in vitro in culture medium with or without RT and HR. The second experiment was divided into two treatments, the treatment was first investigated the efficiency of both retinoids distributed in oocytes in TCM 199, and the second treatment was investigated the efficacy of RT, RA, or IGF-I of zygotes in KSOM medium using the same means in conjunction with the monolayer of oviduct cells (MCO). A total 4320-cumulus-oocyte complex obtained by aspiration from follicles (2-6 mm in diameter) ovarian animals slaughtered in abattoirs were selected for IVM and incubated in TCM 199 at 39 ° C in air with 5% CO₂ for 24 hours. Thereafter, the oocytes were processed through mDM and exposed to sperm for 18 hours. Presumptive zygotes were placed in drops of KSOM medium enriched with RT, RA, or IGF-I. At the end of the 10th day of co-culture blastocysts were prepared for the location of characteristic changes of apoptosis using the reagent PhiPhiLux-G1D2 and solutions of 4% paraformaldehyde and Phosphate-Buffered Saline + 1 mg / ml polyvinylpyrrolidone . In the first experiment, the activity of caspase enzymes did not differ ($P > 0.05$) between oocytes in the CG (7,20±0,91), GRT (6,60±0,68) and the GAR

(7,30±0,67) and between the GRT and the GAR. The oocytes and blastocysts positive for TUNEL assay were higher ($P < 0.05$), respectively, in the CG (8,20±0,78; 8,70±1,05) than in GRT (5,60±0,52; 4,80±0,51) and the GAR (6,40±0,69; 5,40±0,69), no difference ($P > 0.05$) between the GRT and the GAR. Zygotes GC had lower ($P < 0.05$) capacity development to the blastocyst stage (5.32 ± 0.81) than those of the GRT (7.94 ± 0.93) and GAR (7.36 ± 1.02), no difference ($P > 0.05$) between the GRT and the GAR. In the second experiment, the results showed that the groups of oocytes and embryos treated only with retinoids produced fewer blastocysts ($P < 0.05$) than in groups of oocytes and embryos treated with retinoids associated with IGF-I. As to the blastocyst positive for apoptosis, is assessed by the activity of enzymes caspases or DNA fragmentation, there was no difference ($P > 0.05$) between groups. It is concluded that the addition of retinoids to oocytes maturation medium reduced apoptosis and cell association of retinoids with IGF-I is beneficial and can be recommended to enhance in vitro production of goat embryos.

Key words: retinol, retinoic acid, IGF-I, IVM, IVF, blastocyst.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA
Doctor's Tese in Veterinary Science
Recife, July, 2011.

1. INTRODUÇÃO

As espécies ruminantes, por constituírem grande fonte de proteína animal para alimentação da espécie humana, representam um importante setor da economia de países produtores e, por isso, necessitam de suporte técnico para viabilizar o aumento de sua produtividade. Assim sendo, diversas biotécnicas vêm sendo exaustivamente testadas no sentido de maximizar ferramentas que auxiliem o homem a desenvolver programas de melhoramento genético e de preservar espécies e raças em vias de extinção.

A caprino-ovinocultura no Brasil constitui uma atividade de considerável importância econômica e social. Na última década, biotécnicas como a inseminação artificial e a transferência de embriões vêm sendo regularmente implementadas, se não em larga escala, pelo menos num grande número de animais. Mais recentemente, outras biotécnicas como a fecundação *in vitro* (FIV) tem ocupado lugar de destaque em função do potencial que oferece para acelerar a melhoria genética dos rebanhos (HASLER, 1992).

Normalmente, menos do que 1% dos oócitos são ovulados durante a vida reprodutiva de uma fêmea e a utilização de biotécnicas visando maximizar o número de seus descendentes é uma busca constante dos grupos de pesquisa, especialmente depois do nascimento dos primeiros produtos resultantes do processo de fecundação *in vitro* obtidos, respectivamente, por Brackett et al. (1982) e Younis et al. (1991). Como consequência, as técnicas de clonagem, microinjeção e sexagem associadas à produção *in vitro* de embriões deverão, a curto e médio prazo, transformar o modelo atual da produção pecuária.

A produção *in vitro* (PIV) de embriões é um procedimento que consiste das etapas de maturação e fecundação de oócitos, bem como das fases de cultura ou de co-

cultura de embriões, que se estende desde a fase de zigoto até a de blastocisto. Em bovinos, a adição de gonadotrofinas, estradiol, vitaminas e fatores de crescimento aos meios de cultura celular têm determinado um aumento das porcentagens de blastocisto (MONTAGNER, 1999; BORTOLOTTI, 2000; ALVES et al., 2001; LIMA, 2004; LIMA et al., 2004; 2006). Entretanto, como a maturação de oócitos e o desenvolvimento embrionário podem ser afetados por uma variedade de fatores intrínsecos e extrínsecos, nem sempre o efeito de determinada substância sobre a qualidade da estrutura embrionária tem sido convenientemente avaliada (RIEGER et al., 1995).

O principal processo responsável pela redução no número de oócitos observado durante a vida reprodutiva de fêmeas mamíferas (MORITA e TILLY, 1999) e um dos mecanismos de morte celular programada (MCP) induzidos durante o processo de maturação oocitária *in vitro* é a apoptose (TILLY, 2001). Acredita-se que a adição de retinóides ao meio de maturação de oócitos pode maximizar a PIV de embriões caprinos inibindo o processo apoptótico das células, sincronizando os eventos que regulam a maturação, aumentando a competência de fecundação dos oócitos e o desenvolvimento até os estádios de pré-implantação embrionária.

O sucesso na produção *in vitro* de embriões, está em simular a condição *in vivo* do micro ambiente do sistema reprodutivo materno. Assim, os processos de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* de embriões têm demonstrado melhorias significativas pela adição de vitaminas, fatores de crescimento, citocinas e outros micronutrientes (PAULA-LOPES et al., 1998; REZAEI et al., 2003; CAVALCANTI NETO, 2004; LIMA et al., 2004/2006) visando maximizar os índices de produção *in vitro* de embriões.

A vitamina A e seus metabólitos fisiológicos, coletivamente conhecidos como retinóides, classe de compostos que incluem o retinol (RT) e seus derivados metabólitos, como o ácido retinóico (AR), têm profundo efeito sobre a morfogênese embrionária, crescimento e diferenciação celular, visão e reprodução (DELUCA, 1991; ESKILD e HANSSON, 1994; HOFMANN e EICHELE, 1994). Há muito tempo é conhecido que um nível adequado de vitamina A na dieta materna é decisivo para o desenvolvimento normal do embrião (KALTER e WARKANY, 1959) e que o retinol, metabolizado nas células, origina vários compostos fisiologicamente ativos (NAPOLI, 1993).

Acredita-se que os retinóides induzem a diferenciação celular *in vitro* por causar mudanças na expressão dos genes homeobox, dos fatores de crescimento e seus receptores (MOHAN et al., 2001). Todavia, tem-se o conhecimento de que os retinóides contribuem para elevar a PIV de embriões bovinos que atingem o estágio de blastocisto (MONTAGNER, 1999; DUQUE et al., 2002a; LIMA, 2004) seja atuando através da monocamada celular ou sobre as células que circundam o oócito.

Pesquisas demonstraram que os retinóides são essenciais na produção de esteróides ovarianos, maturação de oócitos e no estágio inicial da embriogênese (BAVIK et al., 1991). Estudos têm relatado altas concentrações de retinol em grandes folículos bovinos. *In vivo*, a administração do retinol (SHAW et al., 1995; HIDALGO et al., 2002) e *in vitro*, durante a maturação (BORTOLOTTI, 2000; DUQUE et al., 2002ab; LIMA et al., 2006) ou no desenvolvimento embrionário (MONTAGNER, 1999; CAVALCANTI NETO, 2004; LIMA et al., 2004), assim como a suplementação do meio de maturação com ácido retinóico (DUQUE et al., 2002ab; LIMA et al., 2006) resultou em melhorias no desenvolvimento embrionário.

A adição de AR durante a pré-maturação do CCO na presença de roscovitine melhorou a maturação citoplasmática (Duque et al., 2002a) e concordaram com Lima et al. (2006) que demonstraram efeito positivo no desenvolvimento até o estágio de blastocisto. Adicionalmente, Duque et al. (2002a) mostram evidências que o AR induz a diferenciação do trofoderma, aumenta as taxas da massa celular interna nessa estrutura e eleva as taxas de prenhez. Efeito positivo em se adicionar os retinóides ao meio de cultura de embriões bovinos com ou sem a monocamada de células do oviduto foi observado por Lima et al. (2004) e em embriões caprinos por Cavalcanti Neto (2004) sobre monocamada de células da granulosa.

Uma variedade de fatores de crescimento e citocinas vêm sendo investigados e já devidamente reconhecidos no trato reprodutivo da fêmea. Nos últimos anos, os papéis dos fatores de crescimento e das citocinas no controle do desenvolvimento pré-implantacional embrionário têm sido objeto de pesquisa e de interesse, não apenas para mérito da ciência fundamental, mas também para ser utilizado na melhoria da qualidade dos embriões produzidos pela FIV (SIRISATHIEN et al., 2003). No que concerne ao IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina-I) é um agente mitogênico e diferenciador (HILL, 1989) que confere eficiência ao meio de cultura *in vitro* de embriões bovinos, mas necessitando ainda de mais estudos que evidenciem sua importância no meio de cultura de embriões caprinos.

Os fatores de crescimento têm despertado grande interesse devido sua habilidade em atuar na pré-implantação embrionária elevando a qualidade de embriões produzidos pela FIV. Os meios de maturação quimicamente definidos podem ser usados como modelo para identificar, com precisão, os benefícios que diferentes tratamentos podem ter no desenvolvimento embrionário. A maturação de oócitos bovinos na presença do IGF-I resultou em altas taxas de clivagem quando comparados àqueles

maturados apenas em meio quimicamente definido, porém, não apresentou competência na maturação, semelhante àqueles cultivados na presença de soro fetal bovino (SFB) e gonadotropinas (BORTOLOTTI, 2000).

Devido à grande importância da caprinocultura para o Brasil e a necessidade de aumentar a sua produtividade, este estudo teve como principal objetivo estabelecer condições de cultivo de oócitos e embriões caprinos que proporcionem a obtenção de estruturas embrionárias qualitativamente semelhantes àsquelas produzidas *in vivo*, investigando assim, o efeito de dois retinóides (RT e AR) na maturação *in vitro* de óocitos caprinos, assim como de ambos e do IGF-I no meio de cultura de embriões.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Oogênese

No período pré-natal ocorre a formação dos folículos ovarianos e, conseqüentemente dos oócitos nos ruminantes. O processo de liberação dos oócitos pelos folículos ovarianos é precedido pelos eventos da foliculogênese e oogenêse (FIGUEIREDO et al., 2002).

O conjunto de processos envolvidos no desenvolvimento e diferenciação das células germinativas primordiais até a formação do oócito haplóide fecundado é denominado de oogênese (RÜSSE, 1983). Antes de ser incluída no folículo ovariano, a célula oocitária é precedida da evolução de dois tipos celulares sucessivos, as células germinativas primordiais (CGP) e as oogônias. As primeiras têm origem extragonadal com formação durante o período embrionário, onde após a fecundação do oócito pelo espermatozóide, ocorre a formação e evolução do zigoto até o estágio de blastocisto, constituído pelo trofoblasto e embrioblasto. A partir do embrioblasto serão formados os tecidos embrionários ectoderma, o mesoderma e o endoderma. Do endoderma tem origem o saco vitelínico e deste, as células germinativas primordiais, as quais, caracterizadas pela mobilidade e serem altamente invasivas (HIRSFIELD, 1991).

Nos bovinos e ovinos, ainda durante a vida fetal, as células germinativas primordiais migram para o mesênquima da crista genital, ocupam a gônada indiferenciada (WASSARMAN, 1994), perdem a capacidade de mobilidade e multiplicam-se por mitose podendo, na espécie bovina, atingir dois milhões de células por indivíduo (ERICKSON, 1966). Em seguida a um marcante processo de crescimento celular e redistribuição de organelas citoplasmáticas, as células germinativas primordiais multiplicam-se de forma ativa e diferenciam-se em oogônias. Nestas, haverá

sucessivas mitoses, em seguida ocorrerá o estágio de prófase I, sendo denominadas de oócitos primários. Nos núcleos dos oócitos que se encontram na fase de meiose I ocorrerá, sucessivamente, os estádios de leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno. Neste último estágio, também denominado de vesícula germinativa, ocorrerá à primeira parada de meiose que permanecerá pelo menos até que o animal alcance a puberdade. No período em que o núcleo oocitário permanecer na fase de prófase I, o oócito, conjuntamente com as células somáticas inclusas no compartimento folicular, empreenderá uma intensa fase de crescimento, caracterizada por um incremento na atividade transcripcional (síntese de RNA), acúmulo de lipídeos e absorção ativa e/ou passiva de diferentes nutrientes (SUN e MOOR, 1991; SUM et al., 2001).

Com o início da puberdade, algumas horas antes da ovulação, ocorrem liberações pré-ovulatórias de LH e em decorrência, a meiose é retomada e o núcleo oocitário inicia a diacinese. Em seguida, ocorre à condensação da cromatina, tem início o processo de rompimento da vesícula germinativa, o desaparecimento do nucléolo compacto e do envelope nuclear e após, sucessivamente, as fases de metáfase I, anáfase I e telófase I, com a expulsão do primeiro corpúsculo polar e formação do oócito secundário, o qual caracterizado por seu núcleo encontrar-se na segunda divisão meiótica (TSAFRIRI e KRAICER, 1972; DEKEL et al., 1988; BETTERIDGE et al., 1989; HYTTEL et al., 1989; SUN e MOOR, 1991; SUM et al., 2001; SILVA et al., 2002).

Na segunda divisão meiótica, a fase de prófase II, caracterizada por ocorrer de forma rápida e, às vezes inexistente, avança até a fase de metáfase II, culminando com a segunda parada da meiose, estando o núcleo e o citoplasma do oócito aptos para reiniciar o processo. Para a retomada da meiose o oócito deverá ser fecundado pelo espermatozóide, então, no núcleo oocitário ocorrerá, sucessivamente, os

estádios de anáfase II e telófase II, expulsão do segundo corpúsculo polar e formação do oócito haplóide fecundado, determinando o encerramento do processo da oogênese (GONÇALVES et al., 2002; MILOVANOV e SIRARD, 1994; RUMPF et al., 1995).

2.2 Maturação *in vitro* de oócitos

A maturação *in vitro* (MIV) é um processo, no qual oócitos oriundos de pequenos e médios folículos antrais, meioticamente interrompidos (prófase I ou fase de vesícula germinativa), são cultivados em laboratório para se tornarem aptos à fecundação e alcançarem a metáfase II (MII) com expulsão do primeiro corpúsculo polar. No decorrer do crescimento do oócito e no final de sua maturação ocorrem mudanças estruturais e bioquímicas que podem ser percebidas quando o oócito atinge 65 a 70% do seu volume final, ainda no estágio de vesícula germinativa (SCHULTZ, 1986 apud CAVALCANTI NETO, 2004). No oócito de cabra estas mudanças duram 27 horas (MARTINO et al., 1994; RHO et al., 2001).

Os primeiros relatos datam de 1935, quando Pincus e Enzmann observaram a presença de dois pró-núcleos e resultados de clivagem, após ativação partenogênética. A evidência de sucesso na fertilização *in vitro* (FIV) dos mamíferos foi documentada em coelhos por Chang (1959) depois de obter uma prole resultante da combinação de oócitos maturados *in vivo* com espermatozóides capacitados no útero.

O sucesso do sistema de cultura de embriões está na habilidade de se imitar as condições *in vivo* do micro ambiente do sistema reprodutivo materno, que são necessárias para o desenvolvimento embrionário (VANROOSE et al., 2001).

Fundamentalmente, se busca encontrar o meio ideal que proporcione alta qualidade aos

embriões para que continuem se desenvolvendo, realizem a implantação e resultem em nascimento de crias viáveis (MÉNEZO et al., 1998), partindo dos já conhecidos e adicionando-se a estes uma variedade de produtos como sais, aminoácidos, hormônios, substratos energéticos, fatores de crescimento e vitaminas (SIRARD et al., 1988; BERG e BREM, 1989; MARQUANT-LE GUIENNE et al., 1989; SAEKI et al., 1991; GARDNER et al., 1994; BORMANN et al., 2003).

Importante contribuição para a melhoria dos resultados da FIV foi dada por Ball et al. (1983) ao descobrirem que as células do cúmulus são fundamentais no processo de maturação dos oócitos *in vitro*, pela alta taxa de formação pró-nuclear. Um percentual de fecundação, acima de 58%, foi obtido por Iritani et al. (1984) utilizando meio isotônico (m-KRB) na capacitação espermática de espermatozóides bovinos. Foi obtida uma percentagem de 80% de formação pró-nuclear utilizando sêmen tratado com heparina (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1986; PARRISH et al., 1986).

Desta forma, ressalta-se a importância das condições da maturação de oócitos, pois a mesma afeta de forma significativa à capacidade de fecundação, determinando precocemente a competência do desenvolvimento embrionário, predominantemente no estágio inicial de clivagem em consequência do RNAm ter origem nos pools dos oócitos (SIRISATHIEN, 2002).

2.3 Funções das células do *cumulus oophorus* na maturação

As células do *cumulus oophorus* apresentam-se em policamadas compactas e, por ocasião da maturação, sob o estímulo dos hormônios LH e FSH entram em processo de expansão, interrompendo as comunicações com o oócito (HYTTEL, 1987, 1988; SZÖLLÖSI, 1991). Essas células, assim como às da granulosa, são essenciais na

nutrição, crescimento, divisão meiótica, maturação citoplasmática e na fecundação do oócito, (EPPIG, 1980; FUKUI e SAKUMA, 1980). Nas células somáticas que envolvem o oócito, durante as maturações citoplasmática e nuclear, ocorrem modificações morfológicas específicas. As células do cumulus iniciam um arranjo na matriz extracelular, rica em ácido hialurônico, e tal fenômeno é denominado de expansão ou mucificação das células do cumulus (EPPIG et al., 1982; BUCCIONE et al., 1990).

In vitro, a expansão das células do cumulus é visível a partir das 12 horas de cultivo (SUTOVSKY et al., 1993). A presença considerável de glicosaminoglicanos nas células do cumulus impede a ação do estresse oxidativo dos radicais livres sobre os oócitos, evitando a redução na taxa de clivagem (LUVONI et al., 1996) e do choque térmico que bloqueia a síntese de proteínas (EDWARDS e HANSEN, 1997).

As células íntegras do cumulus exercem maior influência no processo de maturação do que no grau de granulação citoplasmática, na atividade ovariana ou no tamanho do folículo (FUKUI e SAKUMA, 1980) em consequência, o desenvolvimento do oócito não é afetado pelo ciclo estral da fêmea doadora (LEIBFRIED e FIRST, 1979; LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1989). A remoção das células do cumulus de oócitos oriundos de pequenos folículos antrais afeta sua habilidade para atingir a maturação nuclear e citoplasmática (SUM et al., 2001).

2.4 Seleção dos folículos e dos oócitos

Os oócitos caprinos podem ser obtidos *in vitro* a partir de punção folicular ou dissecação folicular, em ovários provenientes de abatedouros ou, *in vivo*, por

laparotomia, laparoscopia via flanco e ainda através de punção folicular guiada por ultra-sonografia transvaginal (OLIVEIRA et al., 2004).

Com as técnicas de MIV, obtêm-se um maior número de oócitos com menor capacidade de desenvolvimento embrionário (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1987). Neste sentido, têm grande importância vários fatores que influenciem na capacidade dos oócitos de atingirem plena maturação nuclear e citoplasmática, bem como, a expansão do cúmulus em condições de cultivo.

A escolha dos folículos a serem aspirados é o primeiro passo no processo, sendo que o tamanho e a aparência macroscópica estão diretamente relacionados a determinadas características dos oócitos neles contidos. Nos caprinos, de acordo com Gall et al. (1996), os oócitos competentes para a maturação estão dentro dos folículos com diâmetro superior a 3 mm. Deste modo, os oócitos também precisam alcançar um diâmetro mínimo para reiniciar a meiose que, em bovinos é de 110 μm (HYTTEL et al., 1997) e em caprinos 119 μm , para Ariyaratna e Gunawardana (1997), e de 125 μm para Rodríguez-González et al. (2002). A fase do ciclo estral da fêmea não tem influência na capacidade de desenvolvimento dos oócitos (SIRARD et al., 1988; LEIBFRIEDGE-RUTLEDGE et al., 1987).

A adequada seleção dos oócitos obtidos por aspiração permite aumentar as taxas de desenvolvimento embrionário, diminuindo variações nos resultados. Com oócitos cobertos com 3 ou mais camadas completas e aderidas de cúmulus ou com cúmulus intacto, com citoplasma homogêneo, de coloração marrom e sem grânulos rugosos é possível conseguir melhores resultados do que com oócitos com cúmulus incompleto ou expandido (YANG et al., 1990; HAZAKEGER e STUBBINGS, 1992). Todavia, em caprinos, o emprego dos oócitos na MIV, não obedece a um critério rígido, variando

desde aqueles com cúmulus compacto até os que apresentam apenas uma camada de células do cúmulus (MARTINO et al., 1994; IZQUIERDO et al., 1999).

O transporte dos ovários do matadouro até o início da aspiração folicular pode ser realizado em solução fisiológica (NaCl 0,9%) ou em PBS. A temperatura destes meios de transporte pode afetar a capacidade de desenvolvimento dos oócitos. Os estudos realizados por Yang et al. (1990) demonstraram que os ovários podem permanecer em PBS a 24-25°C durante 11h sem afetar o índice de fecundação nem o desenvolvimento embrionário e a 37°C podem permanecer por até 4h. A armazenagem a 4°C reduz a viabilidade dos oócitos.

2.5 Meios e condições de cultivo

Os oócitos reiniciam e completam a primeira divisão meiótica em diferentes meios, desde simples soluções salinas balanceadas até meios complexos. Os meios utilizados para a FIV devem permitir o metabolismo dos oócitos e células do cúmulus, como também manter a função espermática eficiente (LEIBFRIED e FIRST, 1979; LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1989).

O meio de cultura TCM-199 com sais de Earle é o meio básico mais usado para a maturação de oócitos *in vitro*. Ao compararem sete meios complexos disponíveis comercialmente, Rose e Bavister (1992) concluíram que o TCM-199 e o MEM (Meio Mínimo Essencial) foram igualmente adequados para a maturação dos oócitos, enquanto que o uso de meios de Waymouth MB 752/1 e Ham F-12, utilizados também na maturação, resultou em baixa taxa de clivagem e desenvolvimento até estágio de

blastocistos. Na comparação entre os meios TCM-199 e RPMI-1640, Gliedt et al. (1996) observaram que o desenvolvimento até o estágio de blastocisto, a partir de oócitos maduros, no TCM-199 foi levemente superior aos obtidos no RPMI-1640.

Em geral o TCM-199 é suplementado com uma variedade de substâncias que tem demonstrado contribuir para algumas melhoras no processo de maturação do oócito (LEIBFRIED-RUTLEDGE, 1986).

Outros meios utilizados para o cultivo *in vitro* são o MENEZO B2 (XU et al., 1990), KSOM (ROSENKRANS et al., 1993), DULBECCO'S modificado (SAKKAS et al., 1994) e dependendo do meio, a clivagem é aproximadamente de 60%. A proporção de oócitos que se desenvolvem até blastocistos é fortemente afetado pela combinação das condições de cultivo e meio utilizado, variando entre 2% e 30% (FUKUI et al., 1991).

In vivo, a maturação dos oócitos é precedida pela onda pré-ovulatória de hormônios gonadotróficos. Com o fim de reproduzir *in vitro* as condições de maturação *in vivo*, o uso de FSH, LH e 17β estradiol no meio de cultivo são preconizados por alguns pesquisadores, acreditando-se de forma geral que aumentem a viabilidade do oócito, incrementando as taxas de fecundação e desenvolvimento embrionário normais. Diferentes estudos determinaram que a maturação nuclear e citoplasmática melhoram na presença de LH ou da associação de FSH, LH e 17β estradiol em conjunto (YOUNIS et al., 1989; ZUELKE e BRACKETT, 1990; SAEKI, 1991).

Outro aspecto importante do cultivo *in vitro* é o uso de soro fetal bovino (SFB) ou soro de vaca em estro (SVE) como fontes protéicas para o oócito. Saeki et al. (1991) estudaram a influência do uso de SFB e hormônios no desenvolvimento de oócitos, determinando que a presença do soro melhora a clivagem e o desenvolvimento embrionário. Tal fato deve-se à presença de gonadotrofinas e hormônios esteróides no

SFB (SIRARD et al., 1988; PARRISH, 1991). Foi provado que o SVE é superior ao SFB nas taxas de maturação e fecundação, devido a maior quantidade de hormônio LH que este possui (NAKAWA, 1994). A comparação entre soros de vacas em diferentes fases do ciclo estral mostrou melhores resultados para o soro de vaca em proestro e em estro (YOUNIS, 1989). Outro suplemento utilizado é a albumina sérica bovina (BSA) que constitui uma fonte mais definida de proteínas. A maturação ocorre normalmente em presença de BSA, mas a capacidade fecundante dos oócitos é maior com o uso de soro (ZUELKE e BRACKETT, 1990). A expansão do cumulus ocorre tanto em presença como em ausência de soro, sendo que na presença de soro o ácido hialurônico é retido entre as células do cumulus, e na sua ausência ele é liberado ao meio de cultivo (EPPIG, 1980). Em 1992, Chen et al. identificaram um fator no SFB que estabiliza o ácido hialurônico entre as células do cúmulus.

Tendo em vista a importância das células somáticas no desenvolvimento da capacidade de maturação dos oócitos, numerosos trabalhos têm sido realizados incubando os oócitos em co-cultivo com células da granulosa (CRISTER, 1986; FUKUI e ONO, 1988). No entanto, foi determinado que a adição de células da granulosa não altera a eficácia da maturação dos oócitos (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1987).

Condições de cultivo como temperatura e atmosfera em que são incubados os oócitos influenciam as taxas de maturação e desenvolvimento. A tensão de oxigênio no trato reprodutivo feminino nos mamíferos é mais baixa que no ar atmosférico (MASTROIANNI e JONES, 1965; MITCHELL e YOCHIM, 1968; MAAS et al., 1976; GARRIS e MITCHELL, 1979; FISCHER e BAVISTER, 1993). Foi demonstrado que níveis menores de 20% de O₂ são prejudiciais para a MIV e FIV (PINYOPUMMINTR e BAVISTER, 1994; HASHINOMOTO et al., 2000; WATSON et al., 2000).

Portanto está estabelecido que uma atmosfera com oxigênio reduzido de 20% para 5% influencia positivamente o desenvolvimento do número de zigotos para o estágio de blastocisto em ruminantes (BATT et al., 1991; VOELKEL e HU, 1992; LONERGAN et al., 1996). Cultura sob baixa tensão de oxigênio elimina a necessidade de co-cultura (XU et al., 1992; WATSON et al., 1994; CAROLAN et al., 1995; RIZOS et al., 2001).

Atualmente, as equipes de pesquisa utilizam temperatura de 39°C, atmosfera de 5% de CO₂ em ar e 90% de umidade para maturação fecundação e desenvolvimento embrionário.

2.5.1 Adição de vitaminas aos meios de cultura de oócitos

As vitaminas como componentes do meio de maturação de oócitos têm sido pouco pesquisadas, no entanto, em um trabalho realizado por Bormann et al. (2003) foi adicionado MEM vitaminas (meio mínimo essencial de vitaminas) ao meio quimicamente definido SOFaa (fluido sintético de tuba uterina, com aminoácidos) proporcionando bons resultados na MIV de oócitos caprinos. No entanto, segundo estes mesmos autores, o mecanismo de ação das vitaminas na maturação dos oócitos permanece desconhecido.

Vitamina A é um termo genérico para um grupo de compostos com atividades similares e seus metabolitos fisiológicos, coletivamente conhecidos como retinoides, sendo estes o retinol e o ácido retinóico. São encontrados de forma natural apenas no reino animal (WOLF, 1984) e têm profundo efeito sobre a morfogênese embrionária, crescimento e diferenciação celular, visão e reprodução (DELUCA, 1991; ESKILD e HANSSON, 1994; HOFMANN e EICHELE, 1994). Há muito tempo se conhece que

um nível adequado de vitamina A na dieta materna é decisivo para o desenvolvimento normal do embrião (KALTER e WARKANY, 1959).

O ácido retinóico (AR), derivado da Vitamina A é o mais importante retinóide, no desenvolvimento dos vertebrados, mas o retinol é essencial para a manutenção da prenhez em mamíferos. AR todo trans é convertido reversivelmente em 9-*cis*-AR e outros isômeros. Estes metabólicos exercem a maior atividade biológica, embora o retinol atue indiretamente no processo visual, na espermatogênese (WELLIK et al., 1997) e possivelmente no tecido placentário (SAPIN et al., 2000; JOHANSSON et al., 2001). O AR todo trans e o 9-*cis*-AR entram no núcleo celular e são capazes de ativar receptores de ácido retinóico (RAR), enquanto receptores X retinóide (RXR) são ativados apenas pelo 9-*cis*-AR (MANGELSDORF et al., 1994). Tem sido demonstrado, além disto, que os retinóides estimulam a esteroidogênese pelas células da granulosa *in vitro* e sinergicamente aumentam a habilidade do FSH para induzir os receptores de LH e estimulam as produções de progesterona e AMPc (BAGAVANDOSS e MIDGLEY, 1988).

A maioria das ações dos retinóides é carregada pela ácido retinóico (HARPER et al., 1987) e liga-se com alta afinidade às proteínas receptoras específicas presentes no núcleo dos tecidos-alvo. O complexo ácido retinóico-receptor, interage com a cromatina nuclear para estimular a síntese de RNA dependente de retinóide, resultando na síntese de proteína que atua em uma série de funções fisiológicas (CHAMPE e HARVEY, 1997).

O retinol é metabolizado na célula (NAPOLI, 1993) acionando vários compostos fisiologicamente ativos. Uma proteína específica denominada proteína ligadora do RT é responsável pelo seu transporte sistêmico e intercelular, já sua manutenção no interior da célula é realizada pela proteína ligadora do RT celular. Nesse sentido,

Schweigert et al. (1988) e Schweigert e Zucker (1988) associaram a concentração de RT no fluido folicular com as condições do folículo. Em ovelhas superovuladas, foram inoculadas 500.000 UI de all-*trans* retinol e a concentração de retinol foi alta em folículos normais, baixa em folículos atrésicos e correlacionada positivamente com a concentração de E₂. A proteína ligadora do RT e a proteína ligadora do RT celular foram localizadas apenas nas células da teca de folículos antrais normais (EBERHARDT et al., 1999).

Esta proteína ligadora do retinol carrega o RT do plasma para o fluido folicular através da membrana basal, onde ele pode influenciar a maturação do oócito (EBERHARDT et al., 1999). Ao RT e ao AR são atribuídas relevantes ações durante o processo de maturação dos oócitos, tendo em vista que a ativação dos receptores nucleares para o AR aumenta a proliferação de células germinativas, sugerindo que os genes que se unem e são ativados pelos AR podem ser importantes para a sobrevivência da oogônia e do oócito, impedindo a ocorrência da apoptose dessas células (KOSHIMIZU et al., 1995).

Um valor de aproximadamente 0,32 µg/mL é a concentração de retinol no fluido de folículos antrais normais e de 0,15 µg/mL no fluido de folículos atrésicos (SCHWEIGERT e ZUCKER, 1988). *In vitro*, o RT e o AR presentes nesse fluido estimulam a esteroidogênese por meio das células da granulosa e sinergicamente tornam o FSH melhor habilitado para induzir os receptores de LH e estimular as produções de progesterona e de AMPc (BAGAVANDOSS e MIDGLEY, 1988). Foi relatado melhor competência do oócito suíno para o desenvolvimento com a aplicação de RT diretamente no folículo ovariano (WHALEY et al., 2000). O AR na pré-maturação *in vitro* proporcionou efeito benéfico na diferenciação precoce durante a maturação, no desenvolvimento e qualidade dos blastocistos (DUQUE et al., 2002ab)

e elevou o número de gestações confirmadas no 60º dia na espécie bovina (HIDALGO et al., 2003).

Bortolotto (2000) utilizou RT no meio de maturação e observou índice de clivagem inferior aos dos oócitos maturados em SFB bovino e superior aos do grupo controle maturados no meio TCM-199 modificado. Duque et al. (2002a) adicionaram RT à maturação de oócitos bovinos e não observaram indícios da metabolização dessa substância pelo CCO. Bormann et al. (2003) adicionaram ao meio SOFaa, obtendo resultados significativos na MIV de oócitos caprinos. Contudo, Cavalcanti Neto (2004) avaliou os efeitos da adição do RT e do AR ao meio contendo soro de ovelha no estro de maturação de oócitos, concluindo que nenhum desses retinóides utilizados interfere positivamente no processo de MIV de oócitos caprinos.

A competência no desenvolvimento dos oócitos pode ser melhorada na maturação e na indução da parada meiótica. O propósito da inibição da meiose *in vitro* é obter estabilidade do RNAm e acumular proteína no citoplasma (GÓMEZ et al., 2006). O uso de 5 nM de 9-*cis*-AR durante a inibição meiótica foi mais eficiente do que durante a maturação (DUQUE et al., 2002b). Os oócitos resultantes desse tratamento mostraram migração parcial dos grânulos corticais no início, completando a migração após a maturação, de modo semelhante como ocorre na maturação *in vivo*. As taxas de desenvolvimento de blastocistos, assim como a sobrevivência dos mesmos criopreservados foram melhores quando o 9-*cis*-AR foi adicionado ao meio na pré-maturação dos oócitos. Contudo, altas concentrações de retinóides, por exemplo, o 9-*cis*-AR durante a pré-maturação e na maturação foi prejudicial ao desenvolvimento dos oócitos em todos os parâmetros avaliados.

Sem os recursos da inibição meiótica em processo de maturação de oócitos, a presença de 5 nM do AR no meio causou completa migração dos grânulos corticais e

melhorou o desenvolvimento dos blastocistos, enquanto que concentrações de 500 nM do AR no meio foram tóxicas as estruturas. Portanto, a presença do AR no meio de maturação não elevou a habilidade dos blastocistos vitrificados para a sobrevivência *in vitro*. Não obstante, apenas alguns blastocistos maturados na presença de soro sobreviveram, demonstrando que na avaliação da sobrevivência de blastocistos criopreservados, mais fatores devem ser considerados (GÓMEZ et al., 2003).

Em adição, a efetiva migração dos grânulos corticais que ocorreu quando os oócitos foram maturados na presença do AR, antecipou um ganho no desenvolvimento da competência dos oócitos (GÓMEZ et al., 2003). Em contraste com os blastocistos obtidos dos grupos controle, àqueles obtidos de oócitos maturados em meio quimicamente definido com a presença de AR resultou em prenhez (HIDALGO et al., 2003). No entanto, um sistema de maturação *in vitro* de oócitos caprinos ainda não foi desenvolvido, seguindo-se protocolos similares aos preconizados para bovinos.

Existem evidências que a competência para o desenvolvimento do oócito pode ser aumentada, por meio do suporte com retinóide durante seu crescimento intrafolicular. De fato, a administração de retinol em animais doadores de embriões melhora sua qualidade embrionária em vacas (SHAW et al., 1995), em ovelhas superovuladas (EBERHARDT et al., 1996) e em porcas jovens não superovuladas (WHALEY et al., 1997; WHALEY et al., 2000). Maior número de oócitos e embriões foram obtidos em resposta a superovulação de coelhas que apresentaram maiores níveis sanguíneos de vitamina A (BESENFELDER et al., 1996). Recentemente, foi demonstrado que a produção de oócitos aumentou em vacas doadoras após a aplicação de retinol (HIDALGO et al., 2002), bem como foi observado que a qualidade e o

desenvolvimento até estádios de blastocistos foram maiores naqueles oriundos de complexo oócito-cúmulus maturados na presença de AR (DUQUE et al., 2002). A fim de ligarem-se especificamente ao retinol e regular seus efeitos, as proteínas citoplasmáticas ligadoras de retinol são encontradas em oócitos de vacas (MOHAN et al., 2001) e de ratas (WARDLAW et al., 1997), próximo das células da granulosa de ratas (WARDLAW et al., 1997) e ovários humanos (ONG e PAGE, 1986).

Desta forma, o efeito benéfico da vitamina A durante o crescimento de oócitos *in vivo* pode ser reproduzido pelos derivados do retinol, adicionados ao sistema de cultura *in vitro* onde os oócitos estavam meioticamente parados. A partir da atuação do AR na estabilização ou padrão da atividade genética nas células, este retinóide pode influenciar a maturação citoplasmática e a subsequente capacidade do oócito para o progresso no desenvolvimento. Onde no próprio oócito, a influência do AR pode ser exercida pelas células granulosas do cúmulus (CHIAMENT, 2007).

Duque et al. (2002) quando utilizaram AR na pré-maturação *in vitro* aumentou o número de embriões no cultivo subsequente, na maturação apresentou um efeito significativo na diferenciação precoce e melhorou o desenvolvimento e a qualidade dos blastocistos. O mesmo foi demonstrado por Lima (2004) e Bortoloto (2000), que aumentaram a formação de blastocistos bovinos, quando adicionaram retinol e AR ao meio quimicamente definido.

2.5.2 Apoptose como mecanismo de morte celular

A apoptose é um processo que utiliza ATP como fonte de energia onde células são eliminadas de maneira ordenada. O maquinário de morte celular pode ser ativado de diversas maneiras, através de sinais extracelulares ou intracelulares gerados pela

própria célula, sendo seu principal componente um grupo de enzimas proteolíticas conhecidas como caspases (MARTIN e GREEN, 1995; NICHOLSON e THORNBERRY, 1997).

Aumentos na incidência de morte celular são um importante indicador de um ambiente inadequado para o oócito e embrião tanto *in vivo* como *in vitro*. Por esta razão, conhecimentos detalhados sobre as características da apoptose durante a maturação e o desenvolvimento embrionário são necessários. O conhecimento da apoptose fornece ainda novas informações no processo fisiológico que ocorre durante o crescimento do embrião, as quais podem ajudar na produção de oócitos e embriões de melhor qualidade e conseqüentes melhores taxas de sobrevivência embrionária (BETTS e KING, 2001).

Sabe-se que a apoptose é um processo ativo de autodestruição celular e que morfológicamente caracteriza-se por condensação do núcleo e do citoplasma seguido pela fragmentação da célula e formação de corpos apoptóticos (KERR et al., 1972; MILLS et al., 1998).

Uma vez iniciado, o processo de apoptose mobiliza vários mecanismos celulares que levam a ativação de uma família de enzimas conhecidas como caspases. Caspases são sintetizadas como enzimas inativas que podem ser ativadas por reação de autocatálise ou por outras caspases. De acordo com a atividade biológica, as caspases podem ser classificadas como caspases inflamatórias (caspase-1, -4, -5, -11 e -13), caspases iniciadoras de apoptose (caspases-2, -8, -9 e -10) e caspases efetoras de apoptose (caspase-3, -6, e -7) (STENNICKE e SALVESEN, 1998; STENNICKE e SALVESEN, 2000). Além disso, essas enzimas podem ser divididas de acordo com a especificidade do substrato em caspases do grupo I (caspases-1, -4 e -5) que degradam preferencialmente após seqüências WEXD; caspases do grupo II (caspase-

2, -3 e -7) que degradam preferencialmente após DEXD e caspases do grupo III (caspases-6, -8 e -10) que degradam preferencialmente após seqüências (I/L/V) EXD (THORNBERRY e LAZEBNIK, 1998). A caspase-3 é essencial no processo de apoptose, pois causa a ativação do DNase CAD (caspase-activated DNase) que corta o DNA gerando fragmentos oligonucleosomais (ENARI et al., 1998; SAKAHIRA et al., 1998).

Em embriões bovinos a indução da apoptose pelo estresse é um fenômeno regulado pelo estágio de desenvolvimento embrionário e só acontece em embriões a partir do estágio de 8-16 células (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002b) podendo ocorrer o mesmo em embriões caprinos. A apoptose moderada pode ser considerada um processo favorável que causa a eliminação das células danificadas, sem o comprometimento do embrião como um todo. Desta forma as células danificadas são removidas facilitando o desenvolvimento embrionário (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002a). Em contraste, é de extrema importância que a apoptose seja mantida de forma equilibrada e controlada, pois se for induzida de forma maciça pode causar uma grande redução no número de células e comprometer a viabilidade embrionária. O aparecimento de apoptose em oócitos ou zigotos elimina a única célula viável bloqueando o desenvolvimento.

2.6 Avaliação da maturação

A visualização dos cromossomos se faz imprescindível em estudos de maturação nuclear *in vitro* em oócitos de mamíferos. Para isto, têm sido desenvolvidas diferentes

técnicas que incluem coloração dos oócitos para observação do núcleo em microscópio de contraste de fase ou microscópio eletrônico. As técnicas que foram inicialmente desenvolvidas para a coloração cromossômica basearam-se inicialmente em trabalhos realizados em camundongos (DONAHUE, 1968), sendo que as características do ooplasma deste roedor são totalmente diferentes daquelas encontradas em bovinos. A zona pelúcida (ZP) do oócito de camundongo é mais facilmente digerida pelo ácido acético e seu ooplasma é mais claro, o que facilita sua fixação e coloração para visualização cromossômica.

As técnicas para observação em contraste de fase têm em comum os passos de desnudamento dos oócitos, a fixação com ácido acético e metanol ou etanol em relação 1:3, que pode ser realizada sobre uma lâmina ou em uma placa de *petri* durante 24h, com posterior coloração com aceto orceina (SIRARD, 1990), lacmóide (SHYU, 1990) ou giemsa (SÜSS et al., 1988).

Para a avaliação da maturação nuclear, as etapas geralmente mais usadas nos diferentes estudos são as de VG, MI e MII devido aos diferentes mecanismos de regulação de cada um dos estágios. Também a eficácia das técnicas utilizadas nem sempre é igual para os diferentes estágios de maturação nuclear.

Sincronicamente à maturação nuclear, o citoplasma também passa por transformações expressivas na síntese de proteínas, na reserva lipídica, na migração e na organização das organelas como o complexo golgiano, mitocôndrias e grânulos corticais (HYTTEL et al., 1997). Enquanto as mitocôndrias tendem a um arranjo espacial mais interno, em direção ao centro do oócito, os grânulos corticais se deslocam para a periferia do citoplasma (RUMPF et al., 1995). O aparelho golgiano aumenta gradualmente sua função durante o crescimento do oócito, notada pelo aumento do número de membranas envolvidas na secreção de glicoproteínas para a formação da

zona pelúcida e de substâncias para a estrutura dos grânulos corticais (WASSARMAN e ALBERTINI, 1994). Essas mudanças evidenciam que a manutenção dos oócitos em bloqueio da meiose é fundamental para o acúmulo de moléculas, que serão utilizadas durante a fecundação e o desenvolvimento embrionário (MERMILLOD et al., 1996).

3.0 Fecundação *in vitro*

A FIV foi inicialmente desenvolvida como uma ferramenta para entender aspectos básicos da maturação de oócitos, fecundação e desenvolvimento embrionário. Mais recentemente, tem sido usada para superar problemas de infertilidade em humanos. Em animais domésticos, pode ser usada como tratamento para infertilidade, mas outros usos parecem ser mais importantes. No presente o maior uso da FIV é a produção de uma grande quantidade de embriões. Estes embriões são usados tanto em pesquisa quanto na produção comercial de bovinos (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1987). Outra aplicação desta técnica é a sua utilização em esquemas de melhoramento genético para reduzir o intervalo entre gerações (BETTERIDGE et al., 1989).

O sucesso da FIV está diretamente relacionado com uma perfeita maturação nuclear e citoplasmática de oócitos incubados em ambiente e momento adequados, com espermatozoides viáveis e previamente capacitados. A inseminação pode ser realizada com sêmen obtido do epidídimo ou do ejaculado. Os espermatozoides, após ejaculação, devem sofrer uma série de mudanças bioquímicas para adquirir a habilidade de fecundar, processo denominado capacitação espermática. Este processo é fundamental

para o sucesso da fecundação tanto *in vivo* quanto *in vitro*. A capacitação consiste na retirada de substâncias absorvidas ou incorporadas à membrana plasmática do espermatozóide, principalmente no momento da ejaculação, pelos componentes do plasma seminal (TSAFRIRI e ADASHI, 1994).

Os métodos de capacitação mais utilizados atualmente incluem o uso da heparina adicionada aos meios TALP e FERT-TALP (PARRISH et al., 1986; ROSENKRANS et al., 1993). A heparina atua unido-se às proteínas da superfície do espermatozóide causando a remoção das mesmas e, então, produzindo mudanças intracelulares no pH e Ca^{2+} . As mudanças iônicas intracelulares geram uma cascata de eventos, envolvendo a ativação da adenilato ciclase e modificação da membrana espermática, de forma que o espermatozóide possa ser induzido a reação do acrossomo em resposta à união com a ZP. Outras substâncias utilizadas para capacitação de espermatozoides são a cafeína (que aumenta os níveis de AMPc), o ionoforo A23187 (que incrementa o pH e o AMPc) e análogos do AMPc.

A cafeína tem mostrado aumentar a motilidade espermática nos ejaculados pobres.

Altas concentrações de cafeína (5 mM) exercem uma ação sinérgica com a heparina na taxa de penetração espermática (NIWA et al., 1991). Contudo, concentrações mais baixas de cafeína (2,5-7,5 μ M) têm mostrado serem ineficazes (COSCIANI et al., 2001). Numabe et al. (2001) obtiveram resultados semelhantes ao utilizar pentoxilina (5 mM) associada à heparina, ou associação de cafeína com heparina.

A eficácia do tratamento com heparina aumenta quando aplicada a uma população de espermatozoides de alta motilidade. Várias técnicas para separar espermatozoides têm sido desenvolvidas, sendo o *swim up* e os gradientes de Percoll as mais utilizadas atualmente para este propósito. No *swim up* os espermatozoides com

motilidade migram para a parte superior do meio, ficando na parte inferior o plasma seminal e espermatozóides mortos ou com patologia de cauda (PARRISH et al., 1986).

A outra técnica baseia-se na passagem do sêmen através de diferentes gradientes de Percoll, sendo os espermatozóides vivos separados dos demais constituintes do sêmen com base na diferença de densidade destes componentes. No procedimento utilizando o Percoll, o plasma seminal é removido e provavelmente ocorrem modificações na membrana plasmática do espermatozóide, facilitando a capacitação espermática (PARRISH, 1991). Assim sendo, os espermatozóides obtidos por este método necessitam de menores concentrações de heparina do que os obtidos através da técnica do *swim up* (SCHWEITZER et al., 1995).

É importante salientar que a concentração ótima de heparina varia para o sêmen de diferentes animais, sendo necessário ajustá-la para cada caso (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1989). A concentração ideal de heparina para capacitar espermatozóides de bodes, mesmo usando-se apenas a técnica do *swim up*, tem variado de 10 µg/ml (MALIK et al., 1999; TEOTIA et al., 2001), 20µg/ml (LIM et al., 1999) a 200µg/ml (KESKINTEPE e BRACKETT, 1996; SAMAKÉ et al., 2000), o que obriga a realização de testes prévios para determinar a concentração ideal a ser utilizada em cada sistema de FIV.

Além da importância das técnicas de seleção dos espermatozóides, como anteriormente citado, os diluidores que são utilizados no processamento dos espermatozóides para a FIV, têm uma influência considerável nos resultados obtidos. Ao comparar diluidores para sêmen caprino, Keskin-tepe et al. (1998) perceberam que os melhores resultados na taxa de clivagem foram alcançados quando foi utilizado leite desnatado. Com referência as técnicas de seleção, Rho et al. (2001) concluíram que a

centrifugação de espermatozóides em gradientes de Percoll é a técnica que melhor responde quando comparada com outras (*swim up* e filtração em lâ de vidro).

Outros métodos de capacitação têm sido descritos, tais como o uso da progesterona (DINKIS e BRACKETT, 2000), ciclodestrina (CHOI e TOYODA, 1998) ou xantina-xantina oxidase (O'FLAHERT et al., 1999), entretanto os resultados não superam os da heparina.

A proporção de células espermáticas/oócito na FIV é bem maior que àquela ocorrida *in vivo*. É comum nos sistemas de FIV para bovino a proporção de 5000 a 10000 espermatozóides por oócito. A razão de espermatozóide para oócito abaixo de 500 para 1 reduz significativamente a taxa de clivagem (LONG et al., 1994; WANG et al., 2002).

Após completarem a capacitação, os espermatozóides tornam-se capazes de começar a reação de acrossomo, isto é, mudanças morfológicas que permitem a penetração da ZP pelo espermatozóide e a fusão com a membrana plasmática do oócito (WASSARMAN, 1994). O espermatozóide fertilizante atravessa essa membrana, deixando uma pequena fenda notada muitas horas após a penetração dentro do óvulo (HAFEZ, 2000).

A ZP é uma barreira no oócito que só pode ser alterada por uma combinação de pressão e digestão enzimática (KATZ et al., 1989). É uma matriz extracelular formada principalmente por duas a quatro glicoproteínas, dependendo da espécie animal, tornando-se assim um fator limitante da fecundação entre diferentes espécies (WASSARMAN, 1987).

A reação do acrossomo começa com a união do espermatozóide a uma glicoproteína da ZP, denominada ZP3 (WASSARMAN, 1994). O espermatozóide penetra a ZP através de duas ações, uma enzimática e outra mecânica (ANDERSON,

1991; YANAGIMACHI, 1994). Basicamente o processo é iniciado pelo ingresso massivo de Ca^{2+} extracelular, causando fusões múltiplas entre a membrana externa do acrossomo e a membrana plasmática do espermatozóide, resultando na liberação das enzimas contidas no acrossomo para a penetração do espermatozóide no óvulo (HARPER, 1987). Após a fusão das membranas plasmáticas do espermatozóide e do oócito ocorre a ativação do óvulo. Esta inclui o reinício da meiose e liberação do segundo corpúsculo polar. Após a penetração espermática ocorre a exocitose dos grânulos corticais, levando a modificações na ZP e nos receptores espermáticos que impedem o ingresso de outros espermatozóides. A membrana plasmática do oócito também desenvolve a capacidade de bloquear a penetração de outros espermatozóides (YANAGIMASHI, 1994). O espermatozóide penetra no citoplasma, o envelope nuclear se desintegra e a cromatina começa a descondensar. Os cromossomos do espermatozóide e do oócito são envolvidos por novas membranas formando os pró-núcleos feminino e masculino.

O evento final do processo de fecundação é a singamia. Os pró-núcleos masculino e feminino movem-se em direção ao centro do óvulo, seguindo da quebra dos envelopes nucleares e junção dos dois pró-núcleos. A cromatina difusa se reorganiza dentro dos cromossomos, sintetiza microtúbulos, que passam por uma fenda do envelope nuclear, dando origem a primeira clivagem, marcando o final da singamia (ANDERSON, 1991; YANAGIMACH, 1994).

Na espécie caprina, a penetração do espermatozóide no citoplasma ocorre próximo de quatro horas após a inseminação; enquanto a descondensação das cromatinas e a formação dos pró-núcleos, masculino e feminino, ocorrem de seis para oito horas e, de dez para dezesseis horas após a inseminação, respectivamente (MOGAS et al., 1997).

3.1 Desenvolvimento embrionário

Esta é a fase final da PIV de embriões e compreende os estágios embrionários desde zigoto até blastocisto eclodido, a depender da finalidade do processo. Apesar de subordinar-se indiretamente a uma boa maturação e a uma fecundação eficiente, o cultivo é muito importante, pois é nele que se decide o futuro do embrião. É neste período que tem início o processo de clivagem, acontece a ativação do genoma embrionário, agregação e compactação dos blastômeros, diferenciação do trofoblasto e do botão embrionário, formação e expansão da blastocèle e, finalmente o rompimento da ZP (PRATHER e FIRST, 1988)

As percentagens de desenvolvimento embrionário obtidas com o cultivo *in vitro* de embriões produzidos por MIV e FIV permanecem menores que os processos *in vivo*. Estes índices estão em torno de 40% de mórulas e blastocistos. Os embriões bovinos e caprinos apresentam um bloqueio em seu desenvolvimento *in vitro* no estágio de 8-16 células. Este bloqueio coincide *in vivo* com a transição do controle genético materno ao embrionário (BAVISTER, 1988; PARRISH, 1991). Em caprinos, Onger et al. (2001) demonstraram que tal fato deve-se a deficiência dos meios utilizados na produção dos embriões (maturação, fecundação e cultivo) que, além de prejudicarem as etapas anteriores, promovem o bloqueio do desenvolvimento, inviabilizando o embrião, ainda que os aspectos morfológicos pareçam estar preservados.

Zigotos bovinos fecundados *In vitro* e transferidos a ovidutos de coelhas (FUKUI, 1989) ou de ovelhas (LIU et al., 1997) superam o bloqueio, atingindo o

estágio de blastocisto. Este fato demonstra que a contribuição do oviduto ao desenvolvimento embrionário *in vivo* não é específico entre as espécies (VAN INZEN et al., 1995).

As desvantagens do uso de animais vivos como hospedeiros intermediários tais como: perda de embriões, custo e manutenção dos animais, levaram ao desenvolvimento de métodos alternativos de cultivo para superar o bloqueio *in vitro*. Estes métodos incluem a co-cultura dos zigotos com células epiteliais de oviduto, células da granulosa, vesículas trofoblásticas e células do fígado de rato e búfalo, entre outras. As diferentes co-culturas aumentam o número de células das mórulas e blastocistos cultivados *in vitro*, mostrando um efeito estimulatório destas células nos embriões. Vários fatores tais como o estágio do ciclo estral em que o tecido do oviduto foi obtido ou o período de condicionamento do meio, devem ser melhores definidos para a repetibilidade dos resultados (EYESTONE & FIRST, 1991).

A co-cultura geralmente utilizada é a de células de oviduto. O fluido do oviduto é complexo, formado de componentes iônicos e macromoléculas com pH e osmolaridade semelhantes ao plasma sanguíneo. É rico em proteínas, caracterizado por abundante albumina e imunoglobulinas que entram no lúmen do oviduto por transudação seletiva ou por endocitose (HARPER, 1994).

Gandolfi et al. (1989) demonstraram que as células de oviduto secretam proteínas que são requeridas para o desenvolvimento embrionário normal. Estas proteínas passariam através da ZP, nutrindo o embrião. O meio condicionado com células de oviduto também contém estes fatores embriotróficos (EYESTONE e FIRST, 1991). Em um estudo realizado por Pollard et al. (1991) foi demonstrado que durante o estágio de 4 a 8 células são necessárias células do oviduto no co-cultivo.

Izquierdo et al. (1999), comparando vários meios de cultivo, conseguiram elevar em 10% a produção de blastocistos provenientes de oócitos de cabritas pré-púberes maturados e fertilizados *in vitro*, quando utilizaram a junção de TCM-199 com células do epitélio da tuba uterina.

Os índices de desenvolvimento embrionário podem ser melhorados com a adição de SVE aos meios de co-cultivo, devido à estimulação da produção de fatores embriotróficos nas células epiteliais (WIEMER et al., 1991). O soro é altamente complexo, uma combinação de componentes, incluindo proteínas, ácidos graxos, vitaminas, hormônios e fatores de crescimento (HARPER e BRACKETT, 1993).

Para evitar a variabilidade biológica das co-culturas e dos soros, têm sido desenvolvidos meios denominados quimicamente definidos. Estes permitem estudos mais precisos dos fatores envolvidos no desenvolvimento embrionário e excluem a possível contaminação dos materiais biológicos com agentes infecciosos, por não possuírem produtos de origem animal. Estes meios usam como fonte protéica a BSA, por ser a proteína existente em maior quantidade no sistema reprodutor da fêmea, ou o polyvinilpyrrolidone (PVP) (TROUSON et al., 1994).

O uso da forma recombinante é animador (ECKERT et al., 1998) e sua utilização apresentou resultado semelhante à BSA (Lane *et al.*, 2003). Como fonte de energia utilizam os aminoácidos essenciais (TROUSON et al., 1994; LIU e FOOT, 1995; YOSHIOKA et al., 1997). A adição de glicose nestes meios é prejudicial para o desenvolvimento embrionário inicial, porém, este açúcar deve ser adicionado às 120h de cultivo para obter-se um incremento da percentagem de blastocistos (ELLINGTON et al., 1990; KIM et al., 1993). O aumento significativo do metabolismo da glicose acompanha a formação e expansão da blastocela. O metabolismo total da glicose dobra a partir de mórula e blastocisto (TIFFIN et al., 1991). Na maioria das espécies

mamíferas, a necessidade quantitativa e qualitativa dos componentes que viabilizem o desenvolvimento embrionário ainda não está bem definida (IZQUIERDO et al., 1999).

3.1.1 Adição de Vitamina A ao meio de desenvolvimento embrionário

A adição de vitaminas ao meio de cultivo tem como finalidade elevar a qualidade da produção *in vitro* de embriões. Ainda são poucos os trabalhos para analisar a influência direta dessas substâncias no desenvolvimento de embriões de ruminantes domésticos, particularmente nos caprinos. As ações das vitaminas no desenvolvimento embrionário *in vitro*, ainda não estão totalmente definidas (TSAI e GARDNER, 1994). Gardner et al. (1994) e Olson e Seidel Jr. (2000) observaram que a inclusão de vitaminas no meio de cultivo resultou no aumento do metabolismo da glicose e uma comprovada ação antioxidante.

Dentre as vitaminas pesquisadas para esta finalidade, a vitamina A tem despertado maior interesse pelo profundo efeito sobre a morfogênese embrionária, crescimento e diferenciação celular, visão e reprodução (DELUCA, 1991; ESKILD e HANSSON, 1994; HOFMANN e EICHELE, 1994). Seus compostos biologicamente ativos, segundo Wolf (1984), incluem o RT e seus derivados, o retinal e o AR, os quais são encontrados, de forma natural, apenas no reino animal. Desses, somente o RT exerce a função vitamínica integral, os demais desempenham apenas algumas funções de vitamina e coletivamente, a Vitamina A e seus metabólitos fisiológicos são denominados de retinóides, tanto para englobar as formas sintéticas quanto os análogos sintéticos (SHILS et al., 1994).

O RT é um álcool-lipídico, lipossolúvel, ingerido pelos ruminantes sob a forma de β -caroteno que metabolizado nas células dá origem a vários compostos

fisiologicamente ativos (NAPOLI, 1993). O mecanismo pelo qual o RT do meio intersticial alcança o interior da célula ainda não é totalmente compreendido e como o embrião adquire o RT, sintetiza o AR e controla o transporte celular de ambos (WARDLAW et al., 1997). Segundo Bavik et al. (1991) existem evidências que o RT penetra na célula por meio de um receptor para proteína ligante do RT. Essa proteína específica, conhecida como RBP, está envolvida no transporte sistêmico e intracelular do RT. O seqüestro intracelular do RT é realizado pela proteína ligante do CRBP, que acumula RT, estimula a sua mobilização a partir de ésteres, transfere RT para retinol desidrogenase a fim de ser transformado em retinal e finalmente ao ácido all-*trans*-retinóico (MOHAN et al., 2001).

Embriões de vertebrados são dependentes de AR para efetuar o programa de desenvolvimento codificado no genoma (MORRISS-KAY e WARD, 1999). Em bovinos, existem evidências que o ácido retinóico controla diretamente a expressão gênica durante o desenvolvimento *in vitro* do embrião (MOHAN et al., 2001).

As ações do AR ocorrem através da interação com dois sub-grupos separados dos receptores nucleares, os receptores do AR (RAR α , RAR β e RAR γ) e os receptores X retinóide (RXR α , RXR β e RXR γ). Assim, o complexo receptor-ligante pode ativar ou reprimir genes-alvos específicos através de associação com elementos de respostas específicas localizadas próximas a região promotora (MOHAN et al., 2001).

As unidades funcionais na transdução do sinal do retinóide no gene são denominadas de heterodímeros RAR-RXR. Mohan et al. (2001, 2002) detectaram os subtipos RAR α e RAR γ , RXR α e RXR β e retinolaldeído desidrogenase 2 em embriões bovinos desenvolvidos *in vitro*, a partir de oócitos que atingiram o estágio de blastocistos eclodidos. Os ensaios imunohistoquímicos revelaram a presença de

proteínas para RAR α , RAR γ -2 (MOHAN et al., 2001) e RXR β (MOHAN et al., 2002) no trofoderma e na MCI de blastocistos intactos e eclodidos.

In vitro a ação dos retinóides no desenvolvimento precoce de embriões nas espécies ruminantes, especialmente em caprinos ainda é pouco explorada. Efeito benéfico da adição de retinóides no meio de cultivo para o desenvolvimento precoce de embriões bovinos com retinol foi relatado por Montagner (1999) e Lima et al. (2004) e de caprinos por Cavalcanti Neto (2004). Em bovinos, o efeito positivo do ácido retinóico foi comentado por Duque et al. (2002ab) e Lima et al. (2006) e da vitamina E por Olson e Seidel Jr. (2000). Entretanto, controvérsia nos resultados tem sido demonstrada desde que Duque et al. (2002a), em discordância com Bortolotto (2000) e Lima (2004), mostraram que o RT adicionado ao meio de maturação de oócitos bovinos, não incrementou as taxas de blastocistos. Quando o cultivo embrionário é realizado sobre monocamada de células da tuba uterina, o RT beneficia significativamente o desenvolvimento precoce de embriões bovinos (OLIVEIRA et al., 2003) e caprinos (CAVALCANTI NETO, 2004) sobre monocamada de células da granulosa.

3.1.2 Adição de fatores de crescimento ao meio de desenvolvimento embrionário

A presença de receptores para fatores de crescimento e citocinas nos embriões e no trato reprodutivo de mamíferos indica que essas substâncias podem contribuir de forma positiva na fisiologia embrionária e conseqüentemente no processo de produção *in vitro* de embriões de ruminantes (HARVEY et al., 1995; KAYE e HARVEY, 1995; KANE et al., 1997; MARTAL et al., 1997; SARGENT et al., 1998).

Os fatores de crescimento são muito empregados nos meios de cultura para PIV de embriões com o objetivo de se avaliar a sua influência no sistema produtivo. Entretanto, apesar de ser conhecido que os fatores do crescimento mais comuns estão envolvidos no desenvolvimento pré-implantacional de embriões mamíferos (KANE et al., 1997), vários estudos sobre a adição dos mesmos a meios de cultivo livre de soro não lograram êxito devido às condições inadequadas em que os trabalhos foram realizados. Tais condições foram refletidas, com clareza, através do pobre desenvolvimento de embriões no meio de controle (SHAMSUDDIN, 1994; LEE e FUKUI, 1995). Contudo, o ideal para a avaliação desses fatores é realmente o meio quimicamente definido, pois é isento da interferência dos fatores de crescimento presentes, naturalmente, no soro e aqueles produzidos no sistema de co-cultura (SIRISATHIEN et al., 2003).

O processo de pré-implantação embrionária em mamíferos é mais eficiente quando os embriões são cultivados em grupos, num pequeno volume de meio, do que isolados no mesmo volume ou em grupo, num grande volume de meio (WILEY et al., 1986; KEEFER et al., 1994; CAROLAN et al., 1995; MOESSNER e DODSON, 1995; BRISON e SCHULTZ, 1997; O'NEIL, 1997; PAULA-LOPES et al., 1998). Dessa forma, ações benéficas durante o desenvolvimento pré-implantacional *in vitro* de embriões são atribuídas a substâncias promotoras de crescimento, incluindo fatores de crescimento e citocinas secretadas pelos próprios embriões.

A presença de ligantes e receptores para essas substâncias em embriões mamíferos e no trato reprodutivo feminino reforça a idéia dessas ações (HARVEY et al., 1995; KAYE e HARVEY, 1995; KANE et al., 1997; MARTAL et al., 1997; SARGENT et al., 1998).

Estudos de quebra de genes murinos demonstram que a ausência de um determinado fator não bloqueia o desenvolvimento, sugerindo que há redundância de funções, permitindo que um fator possa ser substituído por outro (SIRISATHIEN et al., 2003).

O sistema IGF, segundo Baxter et al. (1998), é constituído pelo IGF-I e IGF-II, por duas classes de receptores de IGF denominados tipo I e II, de um grupo composto de seis proteínas de ligação com IGF (IGFBP) e de suas proteases. Como particularidade, as proteínas de ligação com IGF têm maior afinidade em se ligar ao próprio IGF do que aos seus receptores (RECHLER, 1993). Tanto o IGF-I quanto o IGF-II, quando presentes nos fluidos biológicos, são normalmente ligantes dependentes dos IGFBPs. Esta situação regula a meia vida do IGF, assim como a distribuição e os sítios-alvos em que este fator de crescimento conecta-se após a liberação das IGFBPs por meio da atividade proteolítica exercida sobre as proteínas de ligação com IGF (CLEMMONS et al., 1998).

O IGF-I é uma proteína básica de cadeia simples, constituída de 70 aminoácidos com três sítios de ligação dissulfito para manter a estrutura terciária, enquanto que o IGF-II é um peptídeo de cadeia simples, levemente ácido, contendo em sua estrutura, 77 resíduos de aminoácidos (RECHLER, 1993).

O IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina-I) é um agente mitogênico e diferenciador (HILL, 1989) que confere eficiência ao meio de cultura *in vitro*, diminuindo a apoptose e elevando a condição do embrião (BYRNE et al., 2002; MAKAREVICH e MARKULLA, 2002; SIRISATHIEN e BRACKETT, 2003). A insulina e o IGF-I são ativos nos estágios iniciais promovendo a clivagem, aumentando a compactação e a taxa de formação de blastocistos e estimulando a síntese protéica nas células do trofoectoderma e do maciço celular interno (GARDNER e KAYE, 1991).

Os efeitos do IGF-I exógeno no desenvolvimento pré-implantacional de embriões bovinos têm sido investigado por diversos autores (FLOOD et al., 1993); Shamsuddin (1994); Lee e Fukui (1995) não observaram efeito positivo em adicionar IGF-I; Herler et al. (1992), por sua vez, observaram efeitos positivos quando associaram IGF-I à co-cultura de células da granulosa; Palma et al. (1997) apenas observaram efeitos positivos quando o soro bovino foi adicionado ao meio de cultura, enquanto Matsui et al. (1995), Prella et al. (2001), Moreira et al. (2002) e Makarevich e Markkula (2002) obtiveram efeitos positivos utilizando meios sem soro. Lima (2004) obteve um aumento na percentagem de embriões bovinos nos estágios de 2-4 células que se desenvolveram para os estágios de blastocistos e blastocistos expandidos.

O IGF-I tem mostrado estimular a proliferação de blastocistos murinos e humanos, principalmente aumentando o número de células da massa celular interna (HARVEY e KAYE, 1992; KAYE et al., 1992; RAPPOLEE et al., 1992). Todavia, nos blastocistos bovinos, o IGF-I aumentou o número de células trofoblásticas sem afetar o número de células da massa celular interna (PRELLE et al., 2000; MAKAREVICH e MARKKULA, 2002). A síntese de proteína nos embriões de camundongo tem mostrado ser estimulada pelo IGF-I exógeno (HARVEY & KAYE, 1992).

O IGF-I também tem demonstrado uma ação anti-apoptótica durante o desenvolvimento embrionário *in vitro* de coelhos (HERLER et al., 1998), de murinos (CHI et al., 2000), de humanos (SPANOS et al., 2000) e de bovinos (MAKAREVICH e MARKKULA, 2002; BYRNE et al., 2002). O uso da expressão do RNAm do IGF-I e do receptor IGF-I como marcadores potenciais de viabilidade embrionária foi descrito em embriões de camundongos (KOWALIK et al., 1999) e de humanos (LIU et al., 1997).

3.2. Avaliação da fecundação *in vitro*

Para a avaliação da fecundação *in vitro*, alguns grupos usam como critério o estágio de 2-4 células (HEISLEIGH e HUNTER, 1985; GORDON e LU, 1990), outros usam a proporção de mórulas/blastocisto (EYESTONE e FIRST, 1989; FUKUI et al., 1990). O nascimento em bovinos constitui o teste definitivo da viabilidade dos embriões de fecundação *in vitro*. Para fins práticos a capacidade de chegar a blastocisto expandido *in vitro* com 8 dias após a fecundação indica uma boa viabilidade embrionária.

4. Referências

ALVES, J. D. R.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; CALDAS, J. G. L.; SANTOS FILHO, A. S. High concentrations of FSH-p on the *in vitro* maturation of *Bos indicus* oocytes. **Ciência Rural**, n. 31, 645-649, 2001.

ANDERSON, G. B. Reproduction in domestic animals. In: CUPPS, P.T. Fertilization, early development, and embryo transfer. 4º ed. New York: **Academic Press Inc.**, p. 279-307, 1991.

ARIYARATNA, H. B. S.; GUNAWARDANA, V. K. Morphology and morphometry of ovarian follicles in the goat. **Small Ruminant Research**, v. 26, p. 123-139, 1997.

ARLOTTO, T. M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; FIRST, N. L. Size distribution and meiotic competence of bovine primary oocytes from two locations in the ovary. **Theriogenology**, v. 33, p. 188, 1990.

BAGAVANDOSS, P.; MIDGLEY, A. R. Biphasic action of retinoides on gonadotropin receptor induction in rat granulosa cells in vitro. **Life Sciences**, v. 43, p. 1607-1614, 1988.

BALL, G. D.; LEIBRIED, M. L.; LENZ, R. W.; AX, R. L.; BAVISTER, B. D.; FIRST, N. L. Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. **Biology Reproduction**, v. 28, n.3, p. 717-25, 1983.

BATT, P. A.; GARDNER, D. K.; CAMERON, A. W. Oxygen concentration and protein source affect the development of preimplantation goat embryos in vitro. **Reproduction Fertility and Development**, v.3, n.5, p.601-607, 1991

BAVIK, C.O. et al. Identification and partial characterization of retinal pigment epithelial membrane receptor for plasma retinol-binding protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 14978-14985, 1991.

BAVISTER, B. D. Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro. **Theriogenology**, v. 29, p. 143-154, 1988

BAXTER, R.C. et al. Recommendations for nomenclature of the insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) superfamily. **Growth Horm IGF Res**, v.8, n.3, p.273-274, 1998.

BERG, U.; BREN, G. In vitro production of bovine blastocysts by in vitro maturation and fertilization of oocytes and subsequent in vitro culture. **Zuchthygiene**, v. 24, p. 132-139, 1989.

BESENFELDER, U L.; SOLTI, J.; SERGI, M.; BREM, G. Different roles for B-carotene and vitamin A in the reproduction of rabbits. **Theriogenology**, v.45, p.1583-91, 1996.

BETTERIDGE, K. J.; SMITH, C.; STUBBINGS, R. B. *et al.* Potencial genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 38, p. 87-98, 1989.

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

BORMANN, C. L.; ONGERI, E. M.; KRISHER, R. L. The effects of vitamins during maturation of caprine oocytes on subsequent developmental potencial in vitro. **Theriogenology**, v. 59, p. 1373-1380, 2003.

BORTOLOTTI, E. B. PDGF, retinol and insulin in the regulation of bovine oocyte nuclear maturation and their consequent effect in the embryonic development. 2000. 55p. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria.

BRACKETT, B. G. *et al.* Normal development following in vitro fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v.27, n.1, p.147-158, 1982.

BRISON, D. R.; SCHULTZ, R. M. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. **Biology of Reproduction**, v.56, n.5, p.1088-1096, 1997.

BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.; EPPIG, J. Interactions between somatics cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biology of Reproduction**, v.43, p.543-547, 1990.

BYRNE, A. T.; SOUTHGATE, J.; BRISON, D.R. *et al.* Regulation of apoptosis in the bovine blastcist by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) super family. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, n.4, p. 489-495, 2002.

CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; VAN LANGENDONCKT, A.; MERMILLOD, P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviductal fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. **Theriogenology**, v.43, p.1115-1128, 1995.

CAVALCANTI NETO, C. C. Uso do retinol na produção *in vitro* de embriões caprinos. 113p. 2004. **Tese** (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais.

CHANG, M. C. Fertilization of rabbit ova in vitro. **Nature**, v. 184, p. 466-467, 1959.

CHAMPE, P. C. e HARVEY, R. A. **Bioquímica Ilustrada**. 2ª ed. Artes Médicas. Porto Alegre: RS, 1997, 446p.

CHEN, L.; MAO, S. J.; LARSEN, W. J. Identification of a factor in fetal bovine serum that stabilizes the cumulus extracellular matrix. **Journal Biology Chemistry**, v. 267, p. 12380-12386, 1992.

CHIAMENTI, A. Adição de retinóides e de fator de crescimento (IGF-I) aos meios de maturação de oócitos e de desenvolvimento *In vitro* de embriões caprinos. 132p. 2007. **Tese** (Doutorado em Ciência Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

CHI, M. M.; SCHLEIN, A. L.; MOLEY, K. H. High insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-1 receptor. **Endocrinology**, v.141, p.4784-4792, 2000.

CHOI, Y. H.; TOYODA, Y.; Cyclodextrin removes cholesterol from mouse sperm and induces capacitation in a protein-free medium. **Biology of reproduction**, v. 59, n. 6, p. 1328-33, 1998.

CLEMMONS, D. R. et al. Modifications of insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. **Endocrinology Journal**, v.45, Suppl: p.1-8, 1998.

COSCIONI, A. C.; REICHENBACH, H. D.; SCHWARTZ, J.; LAFALC, I V. S.; RODRIGUES, J. L.; BRANDELLI, A. Sperm function and production of bovine embryos in vitro after swim-up with different calcium and caffeine concentration. **Animal Reproduction Science**, n.67, v. 3, p. 59-67, Jul, 2001.

COSTA, E. P.; VALE FILHO, V. R.; NOGUEIRA, J. C. *et al.* Cultivo in vitro de oócitos bovinos em diferentes sistemas: I – efeito na maturação. **Arq. Bras. Vet. Zootecn.**, v. 49, n. 5, p. 551-559, 1997.

CRISTER, E. S.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; EYSTONE, W. H. *et al.* Acquisition of developmental competence during maturation in vitro. **Theriogenology**, v. 25, p. 150, 1986.

DELUCA, L. M. Retinoids and their receptors in difeferentiation embryogenesis, and neoplasia. **FASEB Journal**, n.5, p.2924-33, 1991.

DEKEL, N.; GALIANI, D.; BEERS, W. Induction of maturation in follicle-enclosed oocytes: the response to gonadotropins at different stages of follicular development. **Biology of Reproduction**, v.38, p.517-521, 1988.

DINKINS, M. B.; BRACKETT, B. G. Chlortetracycline staing patters of frozen-thawed bull spermatozoa treated with beta-ciclodextrins, dibutyryl cAMP and progesterone. **Zygote**, v. 8, n.3, p. 245-56, 2000.

DONAHUE, R. Maturation of the mouse oocyte in vitro. Sequence and timing of nuclear progression. **J. Exp. Zool.**, v. 169, p. 237-250, 1968.

DUQUE, P. *et al.* Enhancement of development capacity of meiotically inhibited bovine oocytes by retinoic acid. **Human Reproduction**, v.17, n.10, p.2706-2714, 2002b.

DUQUE, P.; GÓMEZ, E.; HIDALGO, C.; FACAL, N.; FERNÁNDEZ, I.; DÍEZ, C. Retinoic acid during in vitro maturation of bovine oocytes promotes embryonic development and early differentiation. **Theriogenology**, n.57, p.364, 2002a.

EBERHARDT, D. M.; DORÉ, J. J.; JACOBS, W. G. et al. Steroid regulation of retinol binding protein in the ovine oviduct. In: 29th ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR THE STUDY OF REPRODUCTION. Ontario, Canadá: The University of Western Ontario. **Biology of Reproduction**, v.54, n.1, p.118, 1999.

ECKERD, J.; PUGH, P. A.; THOMPSON, J. G. Exogenous protein affects developmental competence and metabolic activity of bovine preimplantation embryos in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 10, n. 4, p. 327-332, 1998.

EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation to heat shock. **Molecular Reproduction and Development**, v.46, p.138-145, 1997.

ELLINGTON, J. E.; FARREL, P. B.; CARNEY, E. W. *et al.* In vitro developmental potential of bovine zygotes in oviduct epithelial cell co-culture systems. **Theriogenology**, v. 33, n. 1, p. 223, 1990.

ENARI, M. et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature**. v.391, p.43-50, 1998.

EPPIG, J. J. et al. Differential action of sulfated glycosaminoglycans on follicle stimulating hormone-induced functions of cumulus oophori isolated from mice. **Biology of Reproduction**, v.27, p.399-406, 1982.

EPPIG, J. Role of serum in FSH stimulated cumulus expansion by mouse oocyte-cumulus cell complexes in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 22, p. 629-633, 1980.

ERICKSON, B. H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of Animal Science*, v.25, p.800-805, 1966. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, J. V. F. (Eds.) **Biotécnicas aplicadas à reprodução**. São Paulo: Livraria Varela, 2002. Cap.11, p.227-260.

ESKILD, W.; HANSSON, V. A functions in the productive organs. In: BLOMHOFF, R. (editor). **Vitamin A in health and disease**. New York : Marred Dekker, p.531-59, 1994.

EYESTONE, W.H.; FIRST, N.L. Characterization of developmental arrest in early bovine embryos cultured in vitro. **Theriogenology**, v. 35, p. 613-623, 1991.

EYESTONE, W.H.; FIRST, N.L. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.85, n.2, p.715-720, 1989.

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais-MOIFOPA. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, J. V. F. (Eds.) **Biotécnicas aplicadas à reprodução**. São Paulo: Livraria Varela, 2002. Cap.11, p.227-260.

FISCHER, B.; BAVISTER, B.D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.99, n.2, p.673-9, 1993.

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

FUKUI, Y., MCGOWAN, L. T., JAMES, R. W.; PUGH, P. A.; TERVIT, H. R.

Factors affecting the in vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 92, p. 125-131, 1991.

FUKUI, Y. Effect of sera and the steroid hormone on development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviduct epithelial cells. **Journal of Animal Science**, v.23, p.1318-1323, 1989.

FUKUI, Y.; SONOYAMA, T.; MOSHIZUKI, H.; ONO, H. Effects of heparin dosage and sperm capacitation time on *in vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured *in vitro*. **Theriogenology**, v. 34, p. 579-571, 1990.

FUKUI, Y.; SAKUMA, Y. Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro*: relation to ovarian activity, follicular size and presence or absence of cumulus cells. **Biology of Reproduction**, v.22, p.669-673, 1980.

FUKUI, Y.; ONO, H. *In vitro* development to blastocyst of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes. **Vet. Res.**, v. 122, p. 282, 1988.

GALL, L.; DE SMEDT, V.; CROZET, N. Meiotically incompetent and competent goat oocytes: timing of nuclear events and protein phosphorylation. **Theriogenology**, v. 46, p. 825-835, 1996.

GANDOLFI, F.; BREVINI, T. A. L.; MOOR, R. M. Effect of oviduct on embryonic development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 38, p. 107-115, 1989.

GARDNER, D. K. et al. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cell: amino acids, vitamins, and culturing embryos in group stimulate development. **Biology of Reproduction**, v.50, p.390-400. 1994.

GARDNER, H. G.; KAYE, P. L. Insulin stimulates mitosis, and morphological development in mouse preimplantation embryos *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 31, p. 19-29, 1991.

GARRIS, D. R.; MITCHELL, J. A. Intrauterine oxygen tension during the estrous cycle in the guinea pig: its relation to uterine blood volume and plasma estrogen and progesterone levels. **Biology of Reproduction**, v.21, n.1, p.149-59, 1979.

GLIEDT, D. W.; ROSENKRANS JUNIOR, C. F.; RORIE, R. W.; MUNYON, A. L.; PIERSON, J. N.; MILLER, G. F.; RAKES, J. M. Effects of media, serum, oviductal cells and hormones during maturation on bovine embryo development *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 4p. 536-42, 1996.

GONÇALVES, P. B. D.; VISITIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L. *et al.* Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002, p. 195-226.

GÓMEZ, E. *et al.* 9-cis-retinoic acid during *in vitro* maturation improves development of the bovine oocyte and increases midkine but not IGF-I expression in cumulus-granulosa cells. **Molecular Reproduction**, v.66, p.247-255, 2003.

GÓMEZ, E. *et al.* Bovine early embryonic development and vitamin A. **Reproduction Domestic Animal**, v.41, p. 63-71, 2006.

GORDON, I.; LU, K. H. Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. **Theriogenology**, v. 33, p. 77-87, 1990.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reproduction in farm animals**. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

HARPER, K. M.; BRACKETT, B. G. Bovine blastocyst development after *in vitro* maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. **Biology of Reproduction**, v.48, n.2, p.409-416, 1993.

HARPER, M. J. K. **The physiology of Reproduction**. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. 2ed. New York: Raven Press, 1994, cap. 4, p. 123-188. Gamete and zygote transport.

HARPER, M. J. Sperm egg transport. In: AUSTIN, C. R. & SHORT, R. V. **Reproduction in mammals**. Cambridge: Cambridge University Press. cap. 5, p. 102-108. 1987.

HARVEY, M. B. et al. Roles of growth factors during peri-implantation development. **Human Reproduction**, v.10, n.3, p.712-718, 1995.

HARVEY, M. B.; KAYE, P. L. Insulin-like growth factor-1 stimulates growth of mouse preimplantation embryos in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v.31, n.3, p.195-9, 1992.

HASHIMOTO, S.; MINAMI, N.; TAKAKURA, R.; YAMADA, M.; IMAI, H.; NAOHIKO, K. Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus oocyte complexes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 57, n.4, p. 353-360, 2000.

HASLER J. F. Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. **Journal of Dairy Science** , v. 75, n.10, p. 2857-79, 1992.

HAZAKEGER, N. L.; STUBBINGS, R. B. Developmental potential of selected bovine oocyte cumulus complexes. **Theriogenology**, v. 37, p. 219, 1992.

HEISLEIGH, H. C.; HUNTER, A. G. In vitro maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent in vitro fertilization and cleavage. **Journal Dairy Science**, v. 68, p. 1456-1562, 1985.

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

HIDALGO, C. O. et al. Pregnancies and improved early embryonic development with bovine oocytes matured *in vitro* with 9-cis-retinoic acid. **Reproduction**, v.125, p.409-416, 2003.

HIDALGO, C.; DÍEZ, C.; DUQUE, P.; FACAL, N.; PRENDES, J. M.; FERNÁNDEZ, I. GÓMEZ, E. Improved cumulus-oocyte complex yields from heifers treated with retinol. **Theriogenology**, v.57, p.672, 2002.

HILL, D. J. Growth factors and their cellular actions. **Journal of reproduction and Fertility**, v. 85, p. 723-734, 1989.

HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovarian. International review of cytology, v.124, p.43-101, 1991. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, J. V. F. (Eds.) **Biotécnicas aplicadas à reprodução**. São Paulo: Livraria Varela, 2002. Cap.11, p.227-260.

HOFMANN, C.; EICHELE, G. Retinoids in development. In: SPORN, M. B.; ROBERTS, A. B.; GOOGMAN, D. S. (editors). **The retinols, biology, chemistry and medicine**. 2.ed. New York :Raven Press, p.387-441, 1994

HOLM, P. et al. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, v.52, n.4, p.683-700, 1999.

HYNES, A. C.; SREENAN, J. M.; KANE, M. T. Uptake and incorporation of myo-inositol by bovine preimplantation embryos from two-cell to early blastocyst stages. **Molecular Reproduction and Development**, v.55, n.3, p.265-269, 2000.

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

HYTTEL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, p.35-47, 1989.

HYTTEL, P. Oocyte maturation and fertilization in cattle - ultrastructural aspects. **Copenhagen; A/S Carl F. Moertensen**, 1988.

HYTTEL, P. Bovine cumulus-oocyte disconnection *in vitro*. **Anatomy and Embryology**, v.176, p.41-44, 1987.

IRITANI, A.; KASAI, M.; NIWA, K.; SONG, H. B. Fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, n. 2, p. 487-92, 1984.

IZADYAR, F. et al. Follicle-stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**. v.51, p.339-345, 1998.

IZQUIERDO, D.; VILLAMEDIANA, P.; PARAMIO, M.T. Effect of cultura media on embryo development from prepubertad gota IVM-IVF oocytes. **Theriogenology**, v.52, p. 847-861, 1999.

JOHANSSON, S.; DENCKER, L.; DANTZER, V. Immunohistochemical localization of retinoid binding proteins at the materno-fetal interface of the porcine epitheliochorial placenta. **Biology Reproduction**, n.64, p.60-8, 2001.

KALTER, H.; WARKANY, J. Experimental production of congenital malformations in mammals by metabole procedure. **Physiology Reviews**, n.39, p.69-115, 1959.

KANE, M. T.; MORGAN, P. M.; COONAN, C. Peptide growth factors and preimplantation development. **Human Reproduction Update**, v.3, n.2, p.137-57, 1997.

KANE, M. T.; BAVISTER, B. D. Vitamin requirements for development of eight-cell hamster embryos to hatching blastocysts *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.39, p.1137-1143, 1988.

KATZ, D. F.; DROBNIS, E. Z.; OVERSTREET, J. W. Factors regulating mamalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestments. **Gam. Res.**, v. 22, p. 443-469, 1989.

KAYE, P. L.; BELL, K. L.; BEEBE, L. F.; DUNGLISON, G. F.; GARDNER, H. G.; HARVEY, M. B. Insulin and the insulin-like growth factors (IGFs) in preimplantation development. **Reproduction, Fertility and Development**, v.4, n.4, p.373-86, 1992.

KAYE, P. L.; HARVEY, M. B. The role of growth factors in preimplantation development. **Progress in Growth Factor Research**, v.6, n.1, p.1-24, 1995.

KEEFER, C. L. et al. *In vitro* culture of bovine IVM-IVF embryos-cooperative interaction among embryos and the roles of growth factors. **Theriogenology**, v.41, p.1323-1331, 1994.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Brazil Journal Cancer**. v.26, p.239-257, 1972.

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

KESKINTEPE, L.; SIMPLICIO, A. A.; BRACKETT, B.G. Caprine blastocyst development after in vitro fertilization with spermatozoa frozen in different extenders. **Theriogenology**, v. 49, n. 7, p. 1265-1274, 1998.

KIM, J.; NIWA, K.; LIM, J. OKUDA, K. Effects of phosphate, energy substrats and amino acidas in development of in vitro matured, in vitro fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 1320-1325, 1993.

KOSHIMIZU, U.; WATANABE, M.; NAKATSUJI, N. Retinoid acid is a potent growth activator of mouse primordial germ cells *in vitro*. **Developmental Biology**, v.168, p.683-685, 1995.

KOWALIK, A.; LIU, H. C.; HE, Z. Y.; MELE, C.; BARMAT, L.; ROSENWAKS, Z. Expression of the insulin-like growth factor-1 gene and its receptor in preimplantation mouse embryos; is it a marker of embryo viability? **Molecular Human Reproduction**, v.5, n.9, p.861-5, 1999.

LANE, M.; MAYBACH, J. M.; HOOPER, K. *et al.* Cryo-survival and development of bovine blastocysts are enhanced by culture with recombinant albumin and hyaluronan. **Molecular Reproduction and Development**, v. 64, n. 1, p. 70-78, 2003.

LANE, M.; GARDNER, D. K. Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of mouse embryos *in vitro*. **Human Reproduction**, v.7, n.4, p.558-562, 1992.

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

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

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; CRITSER E. S.; EYESTONE, W. H. *et al.* Developmental potential of bovine oocytes matured *in vitro*. or *in vivo*. **Biology Reproduction.**, v. 36, p. 376-383, 1987.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; CRITSER, E. S.; FIRST, N. L. Effects of fetal calf serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. **Biology of reproduction**, v. 35, n. 4, p. 850-7, 1986.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; CRITSER, E. S.; PARRISH, J. J. *et al.* *In vitro* maturation and fertilization of bovin. **Theriogenology**, v. 31, p. 61-74, 1989.

LIM, J. M.; LEE, B. C.; LEE, B. S. *et al.* *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes cultured in a chemically defined, protein-free: effects of carbohydrates and amino acids. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 11, n. 2, p. 127-132, 1999.

LIMA, P. F. Utilização de retinóides e fator de crescimento na produção *in vitro* de embriões bovinos. 123p. 2004. **Tese** (Doutorado em Ciência Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

LIMA, PF, Oliveira, MAL, Gonçalves, P.B.D., Montagner, M.M., Reichenbach, H-D., Weppert, Cavalcanti Neto, C.C., M., Pina, V.M.R., Santos, M.H.B. Effects of retinol on the *in vitro* development of *Bos indicus* embryos to blastocysts in two different culture systems. **Reproduction in Domestic Animal**, v.39, p.356-360, 2004.

LIMA, PF, Oliveira, MAL, Santos, M.H.B. Reichenbach, H-D., Weppert, M., Paula-Lopes, F., Cavalcanti Neto, CC, Gonçalves, P.B.D. 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, H. C.; HE, Z. Y.; MELE, C. A.; VEECK, L. L.; DAVIS, O. K.; ROSENWAKS, Z. Expression of IGFs and their receptors is a potential marker for embryo quality. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.38, n.4, p.237-45, 1997.

LIU, Z.; FOOT, R. H. Effects of aminoacids on the development of *in vitro* matured/ *in vitro* fertilization bovine embryos in a simple protein free medium. **Human reproduction**, v. 10, n. 11, p. 2985-2991, 1995.

LONERGAN, P.; CAROLAN, C.; VAN LANGENDONCKT, A.; DONNAY, I.; KHATIR, H.; MERMILLOD, P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.54, n.6, p.1420-9, 1996.

LONG, C. R., DAMIANI, P., PINTO-CORREIA, C., MacLean, R.A., Duby, R.T. and Robl, J.M. Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes matured *in vitro* under various conditions of fertilization. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.102, p.361-369, 1994.

LU, K. H.; GORDON, I.; GALLAGHER, M. *et al.* Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. **Vet. Rec.**, v. 121, p. 259-260, 1987.

LUVONI, G. C.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B. G. Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing media. **Molecular Reproduction and Development**, v.43, p.437-443, 1996.

MAAS, D. H.; STOREY, B.T.; MASTROIANNI, L JR. Oxygen tension in the oviduct of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Fertility and Sterility**, v.27, n.11, p.1312-7, 1976.

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.386-392, 2002.

MALIK, R. K.; LOHAN, I. S.; DHANDA, O. P. *et al.* Peritoneal fluids from rabbits or goats as media for *in vitro* maturation, fertilization and initial culture of caprine oocytes. **Aimal Reproduction Science**, v. 54, p. 195-201, 1999.

MANGELSDORF, D. J.; UMESONO, K.; EVANS, R. M.; The retinoic receptors. In: SPORN, M. B.; ROBERTS, A. B.; GOOGMAN, D. S. (editors). **The retinols, biology, chemistry and medicine**. 2.ed. New York :Raven Press, p.319-49, 1994.

MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GERARD, M.; SOLARI A. *et al.* In vitro culture of bovine egg fertilized either in vivo or in vitro. **Reproduction Nutrition Development**, v. 29, p. 559-568, 1989.

MARTAL, J. *et al.* Recent developments and potentialities for reducing embryo mortality in ruminants: the role of IFN-tau and other cytokines in early pregnancy. **Reproduction Fertility and Development**, v.9, n.3, p.355-380, 1997.

MARTINO, A.; MOGAS, T.; PALOMO, M. J. *et al.* Meiotic competence prepubertal goat oocytes. **Theriogenology**, v. 41, p. 969-980, 1994.

MARTIN, S. J.; GREEN, D. R. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts. **Cell**. v. 82, p.349-352, 1995.

MASTROIANNI, L.; JONES, R. Oxygen tension within the rabbit fallopian tube. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.39, p.99-102, 1965.

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. **Journal of Veterinary Medicine and Science**. n. 57, p. 1109-1111, 1995.

MÉNEZO, L.; STRTINGFELLOW, D.; BIELANSKI, A. Thoughts on risk management for in vitro production of bovine embryos. **Human reproduction**, v. 13, n. 4, p. 256-265, 1998.

MERMILLOD, P.; LONERGAN, P.; CAROLAN, C.; KHATIR, H.; POULIN, N.; COGNIE, Y. In vitro maturation of oocytes from domestic ruminants. **Contraception Fertilite Sexualite**, v. 24, n. 7-8, p. 552-558, 1996.

MILLS, J. C.; LEE, V. M.; PITTMAN, R. N. Activation of a PP2A-like phosphatase and dephosphorylation of tau protein characterize onset of the execution phase of apoptosis. **Journal Cellule Science**. v.111, p.625-636, 1998.

MILOVANOV, C.; SIRARD, M. A. Manipulation of chromosome condensation by protein synthesis inhibitors and cyclic maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.41, n.4, p.819-827, 1994.

MITCHELL, J. A.; YOCHIM, J. M. Measurement of intrauterine oxygen tension in the rat and its regulation by ovarian steroid hormones. **Endocrinology**, v.83, n.4, p.691-700, 1968.

MOESSNER, J.; DODSON, W. C. The quality of human embryo growth is improved when embryos are cultured in groups rather than separately. **Fertility and Sterility**, v.64, n.5, p.1034-1035, 1995.

MOGAS, T.; PALOMO, M. J.; IZQUIERDO, M. D. et al. Morphological events during *in vitro* fertilization of prepuberal goat oocytes maturation *in vitro*. **Theriogenology**, v.48, p.815-829, 1997.

MOHAN, M. Expression patterns of retinoid X receptors, retinaldehyde dehydrogenase, and peroxisome proliferators activated receptor gamma in bovine preattachment embryos. **Biology of Reproduction**, n.66 p. 692-700, 2002

MOHAN, M.; MALAYER, J. R.; GEISERT, R. D.; MORGAN, G. L. Expression of retinol-binding protein messenger RNA and retinoic acid receptors in preattachment bovine embryos. **Molecular Reproduction Development**, n.60, p. 289-92, 2001.

MONTAGNER, M. M. Production of bovine embryo *in vitro* using frozen-thawed media, Hepes and retinol. 1999. 68p. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria.

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, n.2, p.895-907, 2002.

MORITA, Y.; TILLY J. L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. **Development Biologic.** v.213, p.1-17, 1999.

MORRISS-KAY, G. M.; WARD, S. J. Retinoids and mammalian development. **International Review of Cytology**, v.188, p.73-131, 1999.

NAKAWA, A.;SEMPLE, E.; LEIBO, S. P. Influence of serum sources on kinetics of nuclear maturation of bovine oocytes. **Theriogenology.**, v. 41, p. 264, 1994.

NAPOLI, J. L. Biosynthesis and metabolism of retinoic acid: roles of CRBP and homeostasis. **Journal of Nutrition**, n.123, p. 362-66, 1993.

NICHOLSON, D. W.; THORNBERRY, N. A. Caspases: killer proteases. **Trends Biochem. Science.** v. 8, p.299-306, 1997.

NIWA, K.; PARK, C. K.; OKUDA, K. Penetration in vitro of bovine oocytes during maturation by frozen-thawed spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.91, n.1, p.329-36, 1991.

NUMABE, T.; OIKAWA, T.; KIKUCHI, T. Pentoxifylline improve in vitro fertilization and subsequent development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 56, p. 225-233, 2001.

O'FLAHERTY, C. M.; BEORLEGUI, N. B.; BECONI, M. T. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. **Theriogenology**, v. 52, n. 2, p. 289-301, 1999.

OLIVEIRA, D. F. F. et al. Enhanced viability to obtain bovine blastocyst after retinol addition to an embryonic culture medium. **Theriogenology**, v.59, n.1, p.375, 2003.

OLIVEIRA, M.A.L.; REICHENBACH, H-D.; SANTOS, M.H.B.; TENÓRIO FILHO, F. **Aplicabilidade do sacan B na reprodução de pequenos ruminantes**. In: SANTOS, M.H.B.;

OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F. **Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha**. São Paulo: Varela Editora e Livraria LTDA, 2004. p.85-96.

OLSON, S. E.; SEIDEL JR., G. E. Cultura of *in vitro*-produced embryos with vitamin E improves development *in vitro* and after transfer to recipients. **Biology of Reproduction**, v.62, p.248-252, 2000.

O'NEILL, C. Evidence for the requirement of autocrine growth factors for development of mouse preimplantation embryos *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.56, p.229-237, 1997.

ONG, D. E. & PAGE, D. L. Quantitation of cellular retinol-binding protein in human organs. **American Journal of Clinical Nutrition**, n.44, p.425-30, 1986.

ONGERI, E. M.; BORMANN, C. L.; BUTLER, R. E. *et al.* Development of goat embryos after *in vitro* fertilization and parthenogenetic activation by different methods. **Theriogenology**, v. 55, p. 1933-1945, 2001.

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.

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, n.12, p.4756-4760, 1990.

PARRISH, J. J. Application of *in vitro* fertilization to domestic animals. In: Wassarmen, P.M.. **Elements of mammalian fertilization**. Boca Raton: CRC press, cap. 3, p. 111-132. 1991.

PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; CRITSER, E. S.; EYESTONE, W. H.; FIRST, N. L. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v.25, p.591-600, 1986.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN P. J. Apoptosis is an adaptative response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.295, p.37-42, 2002a.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biologic Reproduction**. v.66, p.1169-1177, 2002b.

PAULA-LOPES, F. F. et al. Regulation of preimplantation development of bovine embryos by interleukin-1beta. **Biology of Reproduction**, v.59, n.6, p.1406-1412, 1998.

PINYOPUMMINTR, T.; BAVISTER, B. D. Effect of gaseous atmosphere on *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 41, p. 276, 1994.

POLLARD, J. W.; SCODRAS, J. M.; PLANTE, L. *et al.* Definition of the cleavage stage(s) at which oviductal epithelial cells enable bovine embryos to pass through the *in vitro* 8-16 cell block. **Theriogenology**, v. 35, p. 256 abstract, 1991.

PRATHER, R. S.; FIRST, N. L. A review of early mouse embryogenesis and its application to domestic species. **Journal of Animal Science**, v. 66, p. 2626-2635, 1988.

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 *in vitro* produced bovine embryos. **Endocrinology**, v.142, p.1309-1316, 2001.

PURSELL, V. J.; WALL, R. J. REXROAD, C. E. *et al.* A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. **Theriogenology**, v. 24, n. 6, p. 687-691, 1985.

RAPPOLEE, D. A.; STURM, K. S.; BEHRENDTSEN, O.; SCHULTZ, G. A.; PEDERSEN, R. A.; WERB, Z. Insulin-like growth factor II acts through an endogenous growth pathway regulated by imprinting in early mouse embryos. **Genes and Development**, v.6, n.6, p.939-52, 1992.

RECHLER, M. M. Insulin-like growth factor binding proteins. **Vitamins and Hormones**, v.47, p.1-114, 1993.

RHO, G. J.; HAHNEL, C.; BETTERIDGE, K. J. Comparisons of oocytes maturation times and three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat embryos in vitro. **Theriogenology**, v. 56, n. 3, p. 503-516, 2001.

RIEGER, D.; GRISART, B.; SEMPLE, E.; VAN LANGENDONCKT, A.; BETTERIDGE, K. J.; DESSY, F. Comparison of the effects of oviductal cell co-culture and oviductal cell-conditioned medium on the development and metabolic activity of cattle embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.105, n.1, p.91-98, 1995.

RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. **Theriogenology**, v. 56, n. 1, p. 1-16, 2001.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, E.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; VELLILA, E. *et al.* Selection of prepubertal goats oocytes using the brilliant cresil blue test. **Theriogenology**, v. 57, n. 5, p. 1397-1509, 2002.

ROSE, T. A.; BAVISTER, B. D. Effect of oocyte maturation medium on in vitro development of in vitro fertilized bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, n. 1, p. 72-7, 1992.

ROSENKRANS JUNIOR, C. F.; ZENG, G. Q.; MCNAMARA, G. T.; SCHOFF, P. K.; FIRST, N. L. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 459-462, 1993.

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

RUMPF, R.; BEM, A. R.; PEIXER, M. A. S. *et al.* Fecundação in vitro na espécie bovina: a experiência do CENARGEN. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 19, n. 3-4, p. 219-232, 1995.

RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. *Biblie Anatomic*, v. 24, p.77-92, 1983. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, J. V. F. (Eds.) *Biotécnicas aplicadas à reprodução*. São Paulo: **Livraria Varela**, 2002. Cap.11, p.227-260.

SAEKI, K.; HOSHI, M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, L. M. *et al.* In vitro fertilization and development of bovine oocyte maturation in serum-free medium. **Biology of Reproduction**, v. 44, p. 256-260, 1991.

SAKAHIRA, H.; ENARI, M.; NAGATA, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. **Nature**. v.391, p.96-99, 1998.

SAKKAS, D.; JAKENOUD, N.; LEPPENS, G.; CAMPANA, A. Comparison of results after in vitro fertilize human embryos and cultured in routine medium and in co-culture on vero cells a randomized study. **Fertility and Sterility**, v. 61, p. 521-525, 1994.

SAMAKÉ, S.; AMOHA, E. A.; MOBINI, S. *et al.* In vitro fertilization of goat oocytes during the non-breeding season. **Small Ruminant Research**, v. 35, n.1, p. 49-54, 2000.

SAPIN, V.; CHAIB, S.; BLANCHON, L.; ALEXANDRE-GOUABAU, M. C.; LEMERY, D., CHARBONNE, F.; GALLOT, D.; JACQUETIN, B.; DASTUGUE, B.; AZAIS-BRAESCO, V. Esterification of vitamin A by the human placenta involves villous mesenchymal fibroblasts. **Pediatric Research** n.48, p.565-72, 2000

SARGENT, I. L.; MARTIN, K. L.; BARLOW, D. H. The use of recombinant growth factors to promote human embryo development in serum-free medium. **Human Reproduction**, v.13, Suppl n.4, p.239-48, 1998.

SCHINI, S. A.; BAVISTER, B. D. Development of golden hamster embryos through the two-cell block in chemically defined medium. **Journal of Experimental Zoology**, v.245, n.1, p.111-115, 1988.

SCHWEITZER, C. M.; GONÇALVES, P. B. D.; NEVES, J. P. *et al.* Influência do Percoll na capacitação espermática para fecundação *in vitro* de oócitos bovinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1995, Belo Horizonte, MG. **Anais...** Belo Horizonte: Gráfica da UFMG, 467p., p. 275, 1995.

SCHWEIGERT, F. J. *et al.* Carotene cleavage activity in bovine ovarian follicles. **Theriogenology**, v.30, p.923-930, 1988.

SCHWEIGERT, F. J.; ZUCKER, H. Concentrations of vitamin A, β -caroteno and vitamin E in individual bovine follicles of different quality. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.82, p.575-579, 1988.

SHAMSUDDIN, M. Effect of growth factors on bovine blastocyst development in a serum-free medium. **ACTA Veterinaria Scandinavica**, v.35, p.141-147, 1994.

SHAW, D. W.; FARIN, P. W.; WASHBURN, S. P.; BRITT, J. H. Effect of retinol palmitate on ovulation rate and embryo quality in superovulated cattle. **Theriogenology**, n.44, p.51-58, 1995.

SHILS, M.E. *et al.* **Modern Nutrition in Health and Disease**. 8^a ed., v.1, c.16, p. 287-307, 1994.

SHYU, JEOU-JONG. *In vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes and evaluation of male fertility. Urbana-Champaign, USA. 162p. **Tese** (PhD in Animal Science, Physiology of Reproduction). University of Illinois, 1990.

SILVA, J. R. V. et al. Características morfológicas e controle do crescimento folicular durante a foliculogênese em ruminantes domésticos. **Ciência Animal**, v.12, n.2, p.105-117, 2002.

SIRARD, M. A. Temporary inhibition of *in vitro* meiotic resumption *in vitro* by adenylate cyclase stimulation in immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 33, p. 757-767, 1990.

SIRARD, M. A.; PARRISH, J. J.; WARE, C. B. *et al.* The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 546-552, 1988.

SIRISATHEN, 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.

SIRISATHIEN, S.; BRACKETT, B. G. Tunel analyses of bovine blastocysts after culture with EGF and IGF-I. **Molecular Reproduction and Development**, v. 65, n.1, p.51-56, 2003.

SIRISATHIEN, S. Development and application of bovine *in vitro* fertilization Athens. 2002. **Dissertation** (Doctor of Philosophy) - Faculty of The University of Georgia.

SPANOS, S.; BECKER, D. L.; WINSTON, R. M.; 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.

STENNICKE, H. R.; SALVESEN, G. S. Properties of the caspases. **Biochim Biophys Acta**. v.1387, p.17-31, 1998.

STENNICKE, H. R.; SALVESEN, G. S. Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. **Biochim Biophys Acta**. v.1477, p.299-306, 2000.

SUM, Q. Y. et al. Cytoplasmic changes in relation to nuclear maturation and early embryo developmental potential of porcine oocytes: effects of gonadotropins, cumulus cells, follicular size, and protein synthesis inhibition. **Molecular Reproduction and Development**, v.59, n.2, p.192-198, 2001.

SUN, F. Z.; MOOR, R. M. Nuclear-citoplasmic interactions during ovine oocyte maturation. **Development**, v.111, p.171-180, 1991.

SÜSS, U.; WÜTHRICH, K. stages of the first meiotic division observed in bovine oocytes matured *in vitro*. **Theriogenology**, v. 33, n. 1, p. 231, 1998.

SUTOVSKY, P. et al. Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during *in vitro* of culture of cattle oocyte cumulus complexes. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1277-1287, 1993.

SZÖLLÖSI, D. Maturation de l'ovocyte. In THIBAUT, C. & LEVASSEUR, M. C.: La reproduction chez les mammifères et l'homme. Paris, **INRA/Ellipses**, 1991.

TEOTIA, A.; SHARMA, G. T.; MAJUNDAR, A. C. Fertilization and development of caprine oocytes maturation over granulosa cell monolayers. **Small Ruminant Research**, v. 40, n.2, p. 165-177, 2001.

THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**. v.281, p.1312-1316, 1998.

TIFFIN, G.; RIEGER, D.; BETTERIDGE, K. J.; YADAV, B. R.; KING, W. A. Glucose and glutamine metabolism in pre attachment cattle embryos in relation to sex and stage of development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 93, p. 125-132, 1991.

TILLY, J. L. Commuting the death sentence: how oocyte strive to survive. **Nature Rev Mol Cell Biology**. v.2, p.838-848, 2001.

TROUNSON, A.; PUSHETT, D.; MACLELLAN, L. J. *et al.* Current status of IVM/IVF and embryo culture in humans and farm animals. **Theriogenology**, v. 41, p. 57-66, 1994.

TSAFRIRI, A.; ADASHI, E. Local nonsteroidal regulators of ovarian function. In: Knobil, E., Neill, J. **The Physiology of reproduction**. New York: Raven Press, cap. 15, p. 817-861, 1994

TSAFRIRI, A.; KRAICER, P. The time of ovum maturation in the rat. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.29, p.387-393, 1972.

TSAI, F.C.; GARDNER, D.K. Nicotinamide, a componente of complex culture media, inhibits mouse embryo development *in vitro* and reduces subsequent development potential after transfer. **Fertility and Sterility**, v.61, n.2, p.376-382, 1994.

VAN INZEN, W.G.; VAN STEKELENBURG-HAMERS, A. E. P.; WEIMA, T. A. M. *et al.* Culture of bovine embryos to the blastocist stage using buffalo rat liver cells. **Theriogenology**, v. 43, p. 723-738, 1995.

VANROOSE, G.; VAN SOON, A.; DE KRUIF, A. From co-culture to defined medium: State of the art and pratical considerations. **Reproduction of Domestic animals**, v. 36, p. 25-28, 2001.

VOELKEL, S. A.; HU, Y. X. Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems. **Theriogenology**, v.37, p.1117–1131, 1992.

WANG, W. H.; DAY, B. Y. N. Development of porcine embryos produced by IVM/IVF in a medium with or without protein supplementation: effects of extracellular glutathione. **Zygote**, v.10, n.2, p.109-115, 2002.

WARDLAW, S. A.; BUCCO, R. A.; ZHENG, W. L.; ONG, D. E. Variable expression of cellular retinol-and retinoic acid-binding proteins in the rat uterus and ovary during the estrous cycle. **Biology Reproduction**, n.56, p.125-132, 1997.

WASSARMAN, P. M.; ALBERTINI, D. F.; The mammalian ovum. In: KNOBIL, E. & NEIL, J. **The Physiology of Reproduction**, 2^a ed. New York: Raven Press, p. 79-122, 1994.

WASSARMAN, P. M. Gamete interactions during mammalian fertilization. **Theriogenology**, v. 41, p. 31-44, 1994.

WASSARMAN, P. M. The biology and chemistry of fertilization. **Science**, v. 235, p. 553-560, 1987.

WATSON, A. J.; DE SOUSA, P.; CAVENEY, A.; BARCROFT, L. C.; NATALE, D.; URQUHART, J.; WESTHUSIN, M. E. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number and apoptosis. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 355-364, 2000.

WATSON, A. J.; WATSON, P. H.; WARNES, D.; WALKER, S. K.;

ARMSTRONG, D. T.; SEAMARK, R. F. Preimplantation development of in vitro-matured and in vitro-fertilized ovine zygotes: comparison between coculture on oviduct epithelial cell monolayers and culture under low oxygen atmosphere.

Biology of Reproduction, v.50, n.4, p.715-724, 1994.

WELLIK, D. M.; NORBACK, D. H.; DELUCA, H. F. Retinol is specifically required during midgestation for neonatal survival. **American Journal of Physiology**, n.272, p. 25-29, 1997.

WHALEY, S. L.; HEDGPETH, V. S.; BRITT, J. H. Evidence that injection of vitamin A before mating may improve embryo survival in gilts fed normal or high energy diets. **Journal of Animal Science.**, n.75, P.1071-77, 1997.

WHALEY, S. L.; HEDGPETH, V. S.; FARIN, C. E.; MARTUS, N. S.; JAYES, F. C. L.; BRITT, J. H. Influence of vitamin A injection before mating on oocyte development, follicular hormones, and ovulation in gilts fed high-energy diets. **Journal of Animal Science**, n. 78, p.1598-1607, 2000.

WIEMER, K. E.; WATSON, A. J.; POLANSKI, V.; McKENNA, A. I.; FICK, G. H.; SCHULTZ, G. A. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. **Molecular reproduction and Development**, v. 30, p. 330-338, 1991.

WILEY, L. M.; YAMAMI, S.; VAN MUYDEN, D. Effect of potassium concentration, type of protein supplement, and embryo density on mouse preimplantation development in vitro. **Fertility and Sterility**, v.45, n.1, p.111-119, 1986.

WOLF, G. Multiple functions of vitamin A. **Physiological Reviews**. v.64, p. 873-936, 1984.

XU, K. P.; LOSKUTOFF, M. N.; BETTERIDGE, K. J.; KING, W. A. Imatured zona free bovine oocytes can be matured, fertilized and culture to the blastocyst stage in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 5, p. 104, 1990.

XU, K. P.; YADAV, B. R.; RORIE, R. W.; PLANTE, L.; BETTERIDGE, K. J.; KING, W. A. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized in vitro and co-cultured with bovine oviductal epithelial cells. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.94, n.1, p.33-43, 1992.

YANAGIMACHI, R. Mammalian of fertilization. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. **The Physiology of Reproduction**. 3^a ed. New York. Raven Press, p. 189-318, 1994.

YANG, N. S.; LU, K. H.; GORDON, I. In vitro fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. **Theriogenology**, v. 33, p. 352, 1990.

YOSHIOKA, K.; SUZUKI, C.; IWAMURA, S. Effects of activin A and follistatin on developmental kinetics of bovine embryos: cinematographic analysis in a chemically defined medium. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 118, n. 1, p. 119-125, 2000.

YOSHIOKA, K. et al. Differential patterns of blastulation in bovine morulae cultured in synthetic oviduct fluid medium containing FCS or BSA. **Theriogenology**, v.48, p.997-1006, 1997.

YOUNIS, A. I. et al. *In vitro* fertilization of goat oocytes. **Biology of Reproduction**, v.44, p.1177-1182, 1991.

YOUNIS, A. I.; BRACKETT, B.G.; FAYRER-HOSKEN, R.A. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. **Gamete Res**, v.23, n.2, p.189-201, 1989.

ZUELKE, K. A.; BRACKETT, B. G. Luteinizing hormone-enhance in vitro maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 784-787, 1990.

CAPÍTULO 1

Uso de retinóides para inibir a apoptose *in vitro* de oócitos e embriões caprinos

*(Use of retinoids to inhibit the *in vitro* apoptosis of caprine oocytes and embryos)*

**JC Conceição¹; RM Chaves²; ER Santos Junior¹; JDR Alves¹; FF Paula-Lopes³;
PBD Gonçalves⁴; PF Lima¹; MAL Oliveira^{1(*)}**

¹Laboratório de Biotécnicas Reprodutivas do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900 Recife-PE/Brasil.

²Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual do Maranhão, São Luis-MA/Brasil.

³Universidade Federal de São Paulo, São Paulo-SP/Brasil.

⁴Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS/Brasil.

* Author for corresponding: maloufrpe@uol.com.br

Resumo

Objetivou-se avaliar a ocorrência da apoptose de oócitos e embriões caprinos através da atividade das enzimas caspases do grupo II e da fragmentação de DNA pelo teste de TUNEL, os quais foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV) em meio de cultivo contendo ou não retinol (RT) e ácido retinóico (AR). Os ovários foram obtidos em

abatedouro e transportados ao laboratório em solução fisiológica aquecida a 30°C. Os oócitos foram coletados de folículos medindo de 2 a 6 mm de diâmetro por aspiração com agulha acoplada a seringa. Os oócitos, testados em 10 repetições, foram inicialmente lavados por cinco vezes em meio próprio, posteriormente selecionados e distribuídos nas gotas do meio TCM 199 (Grupo Controle – GC) e deste meio suplementado com Retinol (Grupo Retinol - GRT) ou com Ácido Retinóico (Grupo Ácido Retinóico – GAR), para finalmente serem incubados a 39°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ durante 24 horas. Ao final desse período, uma parte dos oócitos foi processada em meio mDM e exposta aos espermatozoides por 18 horas em idêntica condição atmosférica. Posteriormente, os presumíveis zigotos foram transferidos para as gotas do meio KSOM contendo a monocamada de células do oviduto, sendo finalmente incubados a 39°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Decorridas 48 horas, as estruturas que não clivaram foram removidas e 30% do meio foi parcialmente renovado, permanecendo assim por mais oito dias. A outra parte dos oócitos e os blastocistos de cada grupo experimental foram preparados para localização das alterações características da apoptose, utilizando-se o reagente PhiPhiLux-G1D2 e as soluções de paraformaldeído a 4% e de *Phosphate-Buffered Saline* + 1 mg/mL de *Polivinilpirrolidona*. A atividade das enzimas caspases não diferiu ($P > 0,05$) entre os oócitos do GC ($7,20 \pm 0,91$), do GRT ($6,60 \pm 0,68$) e do GAR ($7,30 \pm 0,67$), bem como entre a do GRT e do GAR. O número de oócitos e blastocistos positivos para o teste de TUNEL foram maiores ($P < 0,05$), respectivamente, no GC ($8,20 \pm 0,78$; $8,70 \pm 1,05$) do que no GRT ($5,60 \pm 0,52$; $4,80 \pm 0,51$) e no GAR ($6,40 \pm 0,69$; $5,40 \pm 0,69$), não existindo diferença ($P > 0,05$) entre os do GRT e do GAR. Os zigotos do GC apresentaram menor ($P < 0,05$) capacidade de desenvolvimento até o estágio de blastocito ($5,32 \pm 0,81$) do que aqueles dos GRT ($7,94 \pm 0,93$) e GAR ($7,36 \pm 1,02$), não existindo diferença ($P >$

0,05) entre os do GRT e do GAR. Os resultados permitem concluir que a adição de retinóides ao meio de maturação de oócitos diminui a atividade apoptótica celular, bem como aumenta a produção *in vitro* de embriões da espécie caprina.

Palavras-chave: retinol, ácido retinóico, MIV, FIV, blastocisto.

Abstract

The objective was to evaluate the apoptosis of goat oocytes and embryos through the activity of enzymes of group II caspases and DNA fragmentation by TUNEL assay, which underwent *in vitro* maturation (IVM) in medium with or without retinol (TR) and retinoic acid (RA). Ovaries were obtained from a slaughterhouse and transported to the laboratory in warm saline at 30 ° C. The oocytes were collected from follicles measuring 2-6 mm in diameter by aspiration with a syringe needle attached. The oocytes, tested in 10 replicates, were initially washed five times on medium itself, then screened and distributed in droplets of TCM 199 (Control Group - CG) and this medium supplemented with retinol (retinol group - GRT) or Retinoic Acid (Group Retinoic Acid - OHR), to finally being incubated at 39 ° C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 24 hours. After this period, a proportion of oocytes was processed through mDM and exposed to sperm for 18 hours in the same atmospheric condition. Subsequently, presumptive zygotes were transferred to drops of KSOM medium containing the monolayer of cells in the oviduct, and finally incubated at 39 ° C in humid atmosphere with 5% CO₂. After 48 hours, the structures that were not cleaved and removed 30% of the medium was partially renovated and remained so for eight days. The other part of the oocytes and blastocysts in each experimental group were prepared to locate the changes characteristic of apoptosis, using the reagent PhiPhiLux-

G1D2 and solutions of 4% paraformaldehyde and Phosphate-Buffered Saline + 1 mg / mL polyvinylpyrrolidone. The activity of caspase enzymes did not differ ($P > 0.05$) between oocytes in the GC ($7,20 \pm 0,91$), do GRT ($6,60 \pm 0,68$) and the GAR ($7,30 \pm 0,67$) and between GRT and the GAR. The oocytes and blastocysts positive for TUNEL assay were higher ($P < 0.05$), respectively, in the CG ($8,20 \pm 0,78$; $8,70 \pm 1,05$) than in GRT ($5,60 \pm 0,52$; $4,80 \pm 0,51$) and the GAR ($6,40 \pm 0,69$; $5,40 \pm 0,69$), no difference ($P > 0.05$) between the GRT and the GAR. Zygotes GC had lower ($P < 0.05$) capacity development to the blastocyst stage (5.32 ± 0.81) than those of the GRT (7.94 ± 0.93) and GAR (7.36 ± 1.02), no difference ($P > 0.05$) between the GRT and the OHR. This result indicates that the addition of retinoids in the middle of oocyte maturation reduces cell apoptosis, and increases in vitro production of goat embryos.

Key words: retinol, retinoic acid, IVM, IVF, blastocyst.

Introdução

A caprinocultura no Brasil constitui uma atividade de elevada relevância sócio-econômica e nas últimas décadas, a inseminação artificial e a transferência de embriões foram empregadas em larga escala. Mais recentemente, a fecundação *in vitro* (FIV) tem ocupado lugar de destaque entre os pesquisadores devido o potencial que oferece para acelerar a melhoria genética dos rebanhos (HASLER, 1992).

A apoptose é o principal processo responsável pela redução do número de oócitos durante a vida reprodutiva de fêmeas mamíferas (MORITA e TILLY, 1999) e um dos mecanismos de morte celular induzidos durante o processo de maturação *in vitro* de oócitos (MIV), segundo Tilly (2001). Do ponto de vista morfológico, a

apoptose caracteriza-se pela agregação e condensação da cromatina, condensação e fragmentação do núcleo, contração e condensação do citoplasma, contração das organelas e formação de vacúolos citoplasmáticos, protusões da membrana plasmática, fragmentação celular e formação de corpos apoptóticos (HARDY, 1999). Do ponto de vista bioquímico é observada permeabilização da membrana mitocondrial externa, liberação de moléculas apoptogênicas, translocação da fosfatidilserina do folheto interno para o folheto externo da MP, ativação de caspases e clivagem da DNase (DNase Dependente de Caspase e clivagem do DNA entre os nucleossomos gerando fragmentos de DNA 180-200 pares de base (HARDY, 1999).

Em oócitos bovinos criopreservados, a apoptose foi também caracterizada por condensação do citoplasma, fragmentação do citoplasma e formação de corpos apoptóticos com ou sem a fragmentação do DNA (MEM et al., 2003). A fragmentação de DNA detectada em oócitos (Van Blerkon e Davis, 1998) e embriões (Xu et al, 2001) pelo ensaio de TUNEL nem sempre é um resultado da ativação das caspases.

A Vitamina A e seus metabólitos fisiológicos, conhecidos como retinóides, desenvolvem importante função na morfogênese embrionária, no crescimento e diferenciação celular, bem como sobre a visão e a reprodução (DELUCA, 1991; ESKILD e HANSSON, 1994; HOFMANN e EICHELE, 1994). O retinol metabolizado nas células origina vários compostos fisiologicamente ativos (NAPOLI, 1993) e a administração de vitamina A na dieta materna é decisivo para o desenvolvimento normal do embrião (KALTER e WARKANY, 1959).

In vitro, os retinóides induzem a diferenciação celular provocando modificações na expressão dos genes homeobox, dos fatores de crescimento e de seus receptores (Mohan et al., 2001), bem como contribuem para elevar a produção *in vitro* (PIV) de

embriões bovinos (Montagner, 1999; Duque Et Al., 2002a; Lima et al., 2004; 2006) e caprinos (CHIAMENTI et al., 2010).

Cavalcanti Neto (2004) não observou alteração nos índices de maturação nuclear e citoplasmática de oócitos caprinos quando adicionou esses retinóides ao meio de maturação. Por outro lado, Duque et al. (2002b) relataram que ácido retinóico proporciona efeito significativo sobre o desenvolvimento e a qualidade dos blastocistos. O mesmo foi verificado por Bortolotto (2000) e Lima et al. (2006) com embriões bovinos e por Chiamenti et al. (2010) com embriões caprinos em decorrência dos retinóides sincronizarem os eventos que regulam a maturação dos oócitos, aumentarem a competência de fecundação dos oócitos e de desenvolvimento até os estádios de pré-implantação embrionária.

Considerando a inexistência de literatura sobre a apoptose de oócitos e embriões caprinos provenientes da PIV, objetivou-se verificar se a adição de retinol (RT) e de ácido retinóico (AR) ao meio de maturação contribui para inibir o processo de apoptose celular de oócitos e de embriões da mencionada espécie..

Material e Métodos

Foram utilizados ovários de fêmeas caprinas obtidos em abatedouro da Região Metropolitana da cidade do Recife – PE. No período máximo de uma hora, os ovários foram transportados ao laboratório em garrafa térmica contendo solução fisiológica aquecida a 30°C contendo 30 µg/mL de sulfato de gentamicina.

Os complexos cumulus-oócitos (CCOs) aspirados com agulha 18 G acoplada a seringa de 5 mL, foram coletados de folículos medindo de 2 a 6 mm de diâmetro e o conteúdo folicular foi depositado em cálice contendo o Meio de Lavagem constituído

por 8,0 mg de bicarbonato de sódio, 45,0 mg de glucose, 5,6 mg de piruvato de sódio, 11,9 mg de HEPES, 2,5 mg de sulfato de gentamicina e 20,0 mg de álcool polivinílico em 50 mL de TALP.

Para sedimentação e obtenção do CCO, o líquido folicular permaneceu em repouso durante 15 minutos a 39°C. Após desprezar o sobrenadante, os CCOs foram depositados em placa de Petri para recuperação e seleção dos oócitos. Após seleção, com base na classificação morfológica descrita por Gonçalves et al. (2008), os oócitos foram lavados (5 vezes) no Meio de Lavagem para em seguida serem aleatoriamente distribuídos (25 oócitos) em gotas de 100 µL do meio de maturação (TCM 199) cobertas com óleo de parafina esterilizada, conforme o grupo experimental (Grupo Controle – GC, Grupo Retinol – GRT, Grupo Ácido Retinóico – GAR).

Nos três grupos experimentais foi utilizado o TCM 199 suplementado com 50 µg/mL de piruvato de sódio, 2,6 mg/mL de bicarbonato de sódio, 50 µg/mL de sulfato de gentamicina, 5,0 µg/mL de FSH/LH (Pluset[®]) e 1 mg/mL de álcool polivinílico. Os oócitos (n = 1380) do GC foram tratados somente com o TCM 199. Os do GRT (n = 1334) foram tratados com o TCM 199 enriquecido com 0,3 µM de retinol e os oócitos (n = 1358) do GAR foram tratados com o TCM 199 acrescido de 0,5 µM de ácido retinóico. Posteriormente, os oócitos foram incubados a 39°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ durante 24 horas. Ao final da MIV e após avaliação da morfologia e da expansão das células do *cumulus*, uma parte dos oócitos (n = 100) foi destinada para ser determinada a atividade das enzimas caspases do grupo II, outra parte (n = 100) foi processada para localização das alterações nucleares (DNA) características da apoptose e uma outra parte foi destinada à FIV.

Os oócitos desnudos foram lavados três vezes em gotas de 100 µL de phosphate-buffered saline (PBS) suplementada com 1 mg/mL de polivinilpirrolidona (PVP) e

incubadas em gotas de 25 μ L de PBS-PVP contendo 5 μ M de phiphilux-G1D2, por 40 minutos, a 39°C protegido da luz. Em seguida, os oócitos foram lavados em PBS-PVP e a atividade enzimática da caspase foi determinada com microscópio de fluorescência.

O ensaio de TUNEL foi realizado desnudando e fixando os oócitos em 100 μ L da solução de 4% de paraformaldeído por uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes em 100 μ L de PBS-PVP e incubados em 100 μ L de meio de permeabilização (0,5% de Triton X-100 contendo 0,1% de citrato de sódio) por uma hora. Após a permeabilização, as amostras foram armazenadas a 4°C até a realização do ensaio de TUNEL. No dia do teste de TUNEL, as amostras foram lavadas, três vezes, em gotas de 100 μ L PBS-PVP e incubadas em 15 μ L da mistura de TUNEL (enzima terminal deoxynucleotidyl transferase) por uma hora a 37°C. Posteriormente, as amostras foram lavadas em PBS-PVP e incubadas com o corante de DNA-DAPI por 15 minutos para novamente serem lavadas em gotas de 100 μ L de PBS-PVP, transferidas para lâminas e cobertas com lamínula e levadas para avaliação em microscópio de fluorescência. Essas técnicas foram conduzidas de acordo com aquelas utilizadas por Paula-Lopes e Hansen (2002ab), bem como por Roth e Hansen (2004).

A coleta e maturação dos CCOs foi realizada como previamente descrito. A FIV foi realizada utilizando-se sêmen fresco, conforme recomendação de Cavalcanti Neto (2004). Cuidadosamente, 0,1 mL de sêmen foi depositado em tubos cônicos de centrífuga contendo 1,5 mL do meio definido modificado (mDM), segundo Keskinetepe et al. (1998), o qual foi constituído de 0,1250 g de glucose, 0,1552 g de bicarbonato de sódio, 0,0069 g de piruvato de sódio, 0,0500 g de álcool polivinílico, 0,0500 g de cafeína e 0,0250 g de penicilamina em 50 mL de mDM. Posteriormente, foram inclinados em ângulo de 45° com a finalidade de se obter a migração espermática ascendente. Decorridos 45 minutos, 0,8 mL da parte superior de cada tubo foi aspirada e

centrifugada a 350 G por 10 minutos. Descartado o sobrenadante, 200 μ L do meio mDM contendo 10 μ g/mL de heparina foi acrescentado a 200 μ L do pellet resultante da centrifugação.

Antes da exposição aos espermatozoides, os oócitos foram também avaliados quanto à morfologia e somente aqueles que apresentaram boa expansão das células do *cumulus* foram lavados no meio Definido Modificado (mDM). Posteriormente, foram transferidos (25 oócitos) para as gotas de 150 μ L do mDM sob óleo de parafina esterilizada, local onde foi depositada a suspensão espermática na concentração final de $2,0 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Os gametas foram incubados em condições atmosféricas idênticas aquelas da MIV durante o período de 18 horas.

Os presumíveis zigotos foram mecanicamente desnudados e transferidos para as gotas de 100 μ L contendo o Potassium Simplex Optimized Medium (KSOM) constituído por 85,15 mM de cloreto de sódio, 8 mM de cloreto de potássio, 2 mM de cloreto de cálcio, 0,5 mM de cloreto de magnésio, 25 mM de bicarbonato de sódio, 5 mM de lactato de sódio, 0,5 mM de piruvato de sódio, 2 mM de glucose, 4,9 mM de glicina e 0,1 mM de glutamina, além da monocamada de células de oviduto (MCO). Estas células foram assepticamente obtidas em matadouro e que foram preparadas conforme técnica utilizada no Laboratório de Biotécnicas da Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE. Decorridas 48 horas de incubação, as estruturas que não clivaram foram removidas e 30% do meio foi parcialmente renovado, permanecendo assim por mais oito dias.

Durante o co-cultivo de oito dias foi averiguado o número de clivagens no 3^o dia (D-3) e o de blastocisto no 8^o dia (D-8). Neste último dia foi também determinado o número de blastômeros positivos para apoptose através da reação do ensaio de TUNEL (fragmentação do DNA), como anteriormente descrito.

Realizou-se análise de variância pelo método dos quadrados mínimos utilizando o procedimento PROC GLM (para variáveis fixas) e PROC MIXED (para variáveis fixas e aleatórias) do pacote estatístico SAS (SAS, 1989). Os dados foram previamente avaliados quanto às premissas para análise de variância (homogeneidade das variáveis e normalidade dos resíduos). As variáveis dependentes e independentes foram estabelecidas de acordo com o delineamento de cada etapa do experimento. Os modelos estatísticos usados incluíram os efeitos principais e todas as possíveis interações. Foi considerado o nível de 5% de significância.

Resultados

Os resultados das análises realizadas para diagnosticar as alterações características de apoptose nos oócitos e embriões estão contidas nas Figuras 1, 2 e 3.

Na Figura 1 constam os dados relativos à atividade das enzimas caspases do grupo II dos oócitos após a MIV. Nela, pode ser observado que os valores médios dos oócitos positivos para esse teste não diferiu ($P > 0,05$) entre os GC, GRT e GAR.

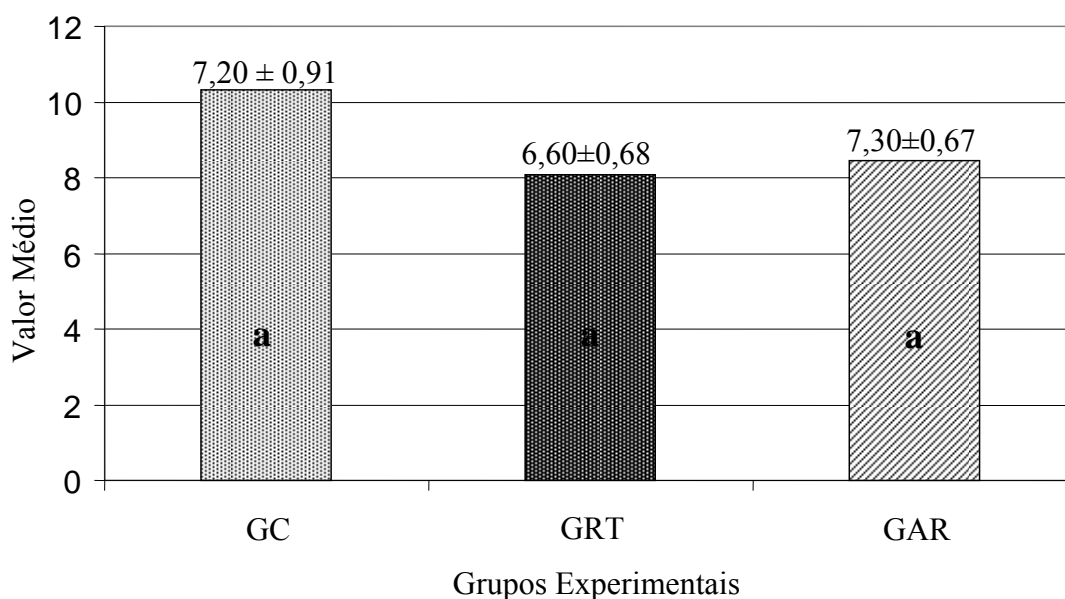


Figura 1: Média e desvio padrão de oócitos caprinos positivo para atividade de enzimas caspases. Letras iguais (a) nas diferentes colunas significam que não existiu diferença estatística ($P > 0,05$).

No que concerne à fragmentação do DNA, o número de oócitos positivos para o teste de TUNEL foi maior ($P < 0,05$) no GC do que no GRT e no GAR (Figura 2), não havendo diferença ($P > 0,05$) entre as porcentagens do GRT e do GAR.

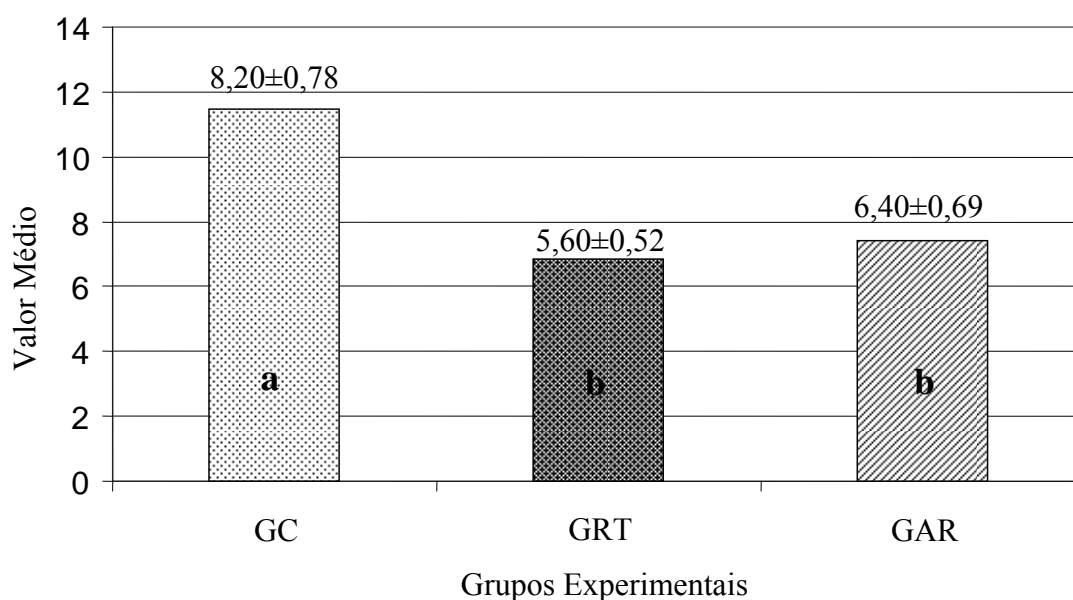


Figura 2: Média e desvio padrão de oócitos caprinos TUNEL-positivo. Letras desiguais (a e b) nas diferentes colunas significam diferença estatística ($P < 0,05$).

O número de blastocistos positivos para o teste de TUNEL após o co-cultivo foi maior ($P < 0,05$) no GC do que no GRT e no GAR, não havendo diferença ($P > 0,05$) entre o GRT e o GRA (Figura 3).

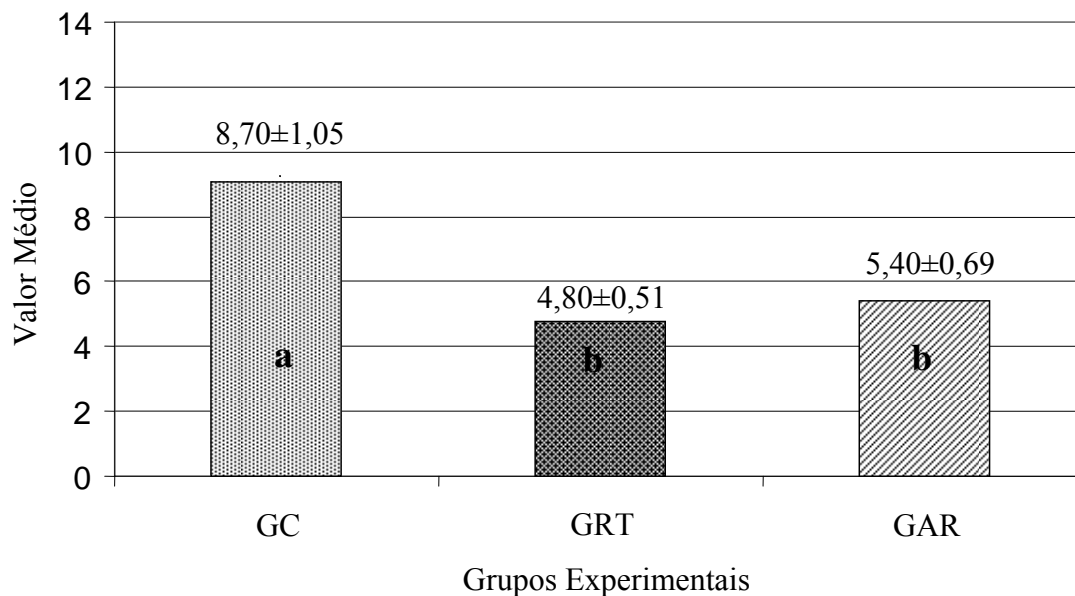


Figura 3: Média e desvio padrão de blastocistos caprinos TUNEL-positivo. Letras desiguais (a e b) nas diferentes colunas significam diferença ($P < 0,05$).

A Figura 4 contém os valores médios das estruturas embrionárias que clivaram no 3^o dia do co-cultivo. Observa-se que a clivagem foi menor ($P < 0,05$) no GC do que no GRT e no GAR, não existindo diferença ($P > 0,05$) entre o GRT e o GAR.

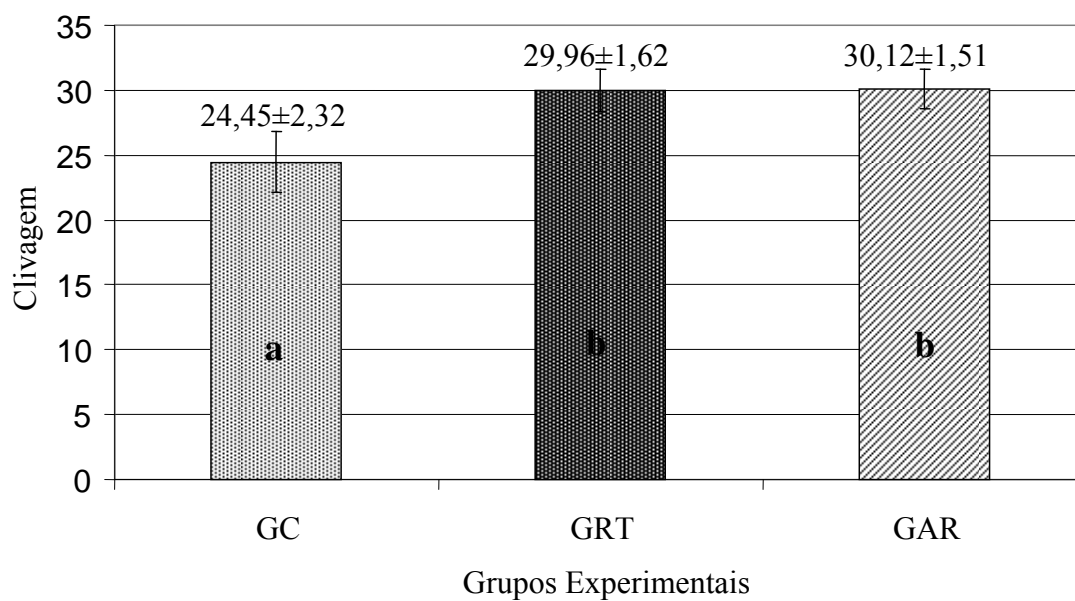


Figura 4: Média e desvio padrão de embriões clivados no 3º dia. Letras desiguais (a e b) nas diferentes colunas significam diferença ($P < 0,05$).

Na Figura 5 estão dispostos os valores médios dos embriões que alcançaram o estágio de blastocisto. Observa-se que os embriões decorrentes dos oócitos tratados com retinol (GRT) e com ácido retinóide (GAR) atingiram o estágio de blastocisto em maior número ($P < 0,05$) do que aqueles não tratados (GC), não existindo diferença ($P > 0,05$) entre o GRT e o GAR.

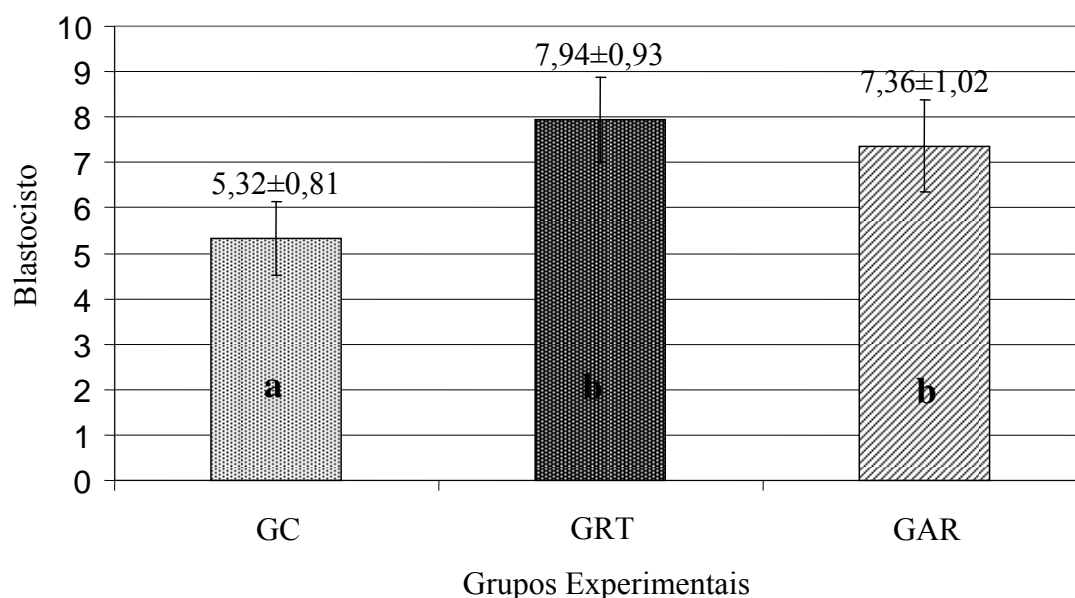


Figura 5: Média e desvio padrão de blastocistos. Letras desiguais (a e b) nas diferentes colunas significam diferença ($P < 0,05$).

Discussão

Os eventos característicos da apoptose, como condensação do citoplasma, fragmentação do citoplasma e formação de corpos apoptóticos com ou sem a fragmentação do DNA, nem sempre ocorrem de forma associada, como relataram Perez

et al. (1999) e Mem et al. (2003). Essas observações corroboram os achados deste estudo tendo em vista que as alterações morfológicas não foram observadas em associação com o aumento da atividade da caspase. Pelo contrário, os oócitos com atividade da caspase apresentaram o citoplasma expandido que é considerado normal na avaliação destas alterações, principalmente naqueles oócitos tratados com os retinóides.

Embriões com um grande número de células apresentam qualidade superior traduzida pela maior capacidade de implantação uterina, bem como pela capacidade de originarem descendentes vivos, segundo Van Soom et al. (1997). Os resultados aqui obtidos sugerem um papel importante dos retinóides na PIV de embriões de boa qualidade em consequência de ter sido observado que os embriões originados de oócitos cultivados na ausência de retinóides apresentam menor potencial de desenvolvimento e maior incidência de apoptose.

Autores como Jurisicova et al. (1996) e Hardy (1997) sugerem que, quando a morte celular programada atinge certo limiar, torna-se prejudicial ao desenvolvimento embrionário. O calendário das primeiras clivagens (D-3) nas espécies humana (Shoukir et al., 1997), bovina (Van Soom et al., 1997) e caprina (Chiamenti, 2007) é considerado um instrumento útil e não invasivo para a seleção de embriões de boa qualidade para a transferência. Em humanos foram obtidas maior número de gestações clínicas com embriões que haviam concluído a primeira clivagem em 25 horas após a FIV (Shoukir et al., 1997). Neste experimento foi observado que a associação entre os retinóides e a MCO elevam as taxas de clivagens.

Mesmo que o efeito positivo dos retinóides em condições *in vivo* tenha sido consistentemente demonstrado por Shaw et al. (1995) e por Hidalgo et al. (2002), existem resultados controversos quanto ao seu benéfico efeito *in vitro*. O resultado adverso obtido por Cavalcanti Neto (2004) ao trabalhar com o RT e o AR durante a

MIV de oócitos caprinos foi explicado devido este autor ter adicionado soro sanguíneo ao meio de maturação que deve ter mascarado o efeito potencial desses retinóides. Posteriormente, Chiamenti et al. (2010) observaram que a adição desses retinóides aos meios de maturação e de desenvolvimento embrionário aumentaram a PIV de embriões caprinos. Tanto o ácido retinóico utilizado por Duque et al. (2002a) quanto o retinol por Bortolotto (2000) durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos aumentou a competência dos oócitos para a MIV e a PIV, resultados igualmente obtidos neste trabalho.

Apesar da necessidade da realização de mais estudos para esclarecer os mecanismos intracelulares envolvidos na co-cultura de células do oviduto e no desenvolvimento embrionário na presença de retinóides, é possível sugerir tratar-se de uma estratégia eficiente e que deve ser adotada para diminuir ou mesmo bloquear a apoptose de oócitos e embriões, com conseqüente aumento da PIV de embriões caprinos.

Referências

BORTOLOTTI, E. B. PDGF, retinol and insulin in the regulation of bovine oocyte nuclear maturation and their consequent effect in the embryonic development. 2000. 55p. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria.

CAVALCANTI NETO, C. C. Uso do retinol na produção *in vitro* de embriões caprinos. 113p. 2004. **Tese** (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Minas Ferais.

CHIAMENTI, A. Adição de retinóides e de fator de crescimento IGF-I aos meios de maturação de oócitos e de desenvolvimento *in vitro* de embriões caprinos. 132p. 2007.

Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária. Universidade Federal Rural de Pernambuco.

CHIAMENTI, A.; [AGUIAR FILHO, C. R. DE](#); [FREITAS NETO, L. M.](#); [CHAVES, R. M.](#); [PAULA-LOPES, F.](#); [LIMA, P. F. DE](#); [GONÇALVES, P. B. D.](#); OLIVEIRA, M. A. L. Effects of retinoids on the *in vitro* development of *Capra Hircus* embryos to blastocysts in two different culture systems. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 68-72, 2010.

DELUCA, L. M. Retinoids and their receptors in differentiation embryogenesis, and neoplastic. **FASEB Journal**, n.5, p.2924-2933, 1991.

DUQUE, P.; GÓMEZ, E.; HIDALGO, C.; FACAL, N.; FERNÁNDEZ, I.; DÍEZ, C. Retinoic acid during *in vitro* maturation of bovine oocytes promotes embryonic development and early differentiation. **Theriogenology**, n.57, p.364, 2002a.

DUQUE, P.; DIEZ, C.; ROYO, L.; LORENZO, P. L.; CARNEIRO, G.; HIDALGO, C. O.; FACAL, N.; GÓMEZ, E. Enhancement of developmental capacity of meiotically inhibited bovine oocytes by retinoic acid. **Molecular Human Reproduction**, v.17, p.2706–2714, 2002b.

ESKILD, W.; HANSSON, V. A function in the productive organs. In: BLOMHOFF, R. (editor). **Vitamin A in health and disease**. New York : Marred Dekker, p.531-59, 1994.

HARDY, K. Cell death in the mammalian blastocyst. **Molecular Human Reproduction**, v.3, p.919-925, 1997.

HASLER J. F. Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. **Journal of Dairy Science** , v. 75, n.10, p. 2857-79, 1992.

HOFMANN, C.; EICHELE, G. Retinoids in development. In: SPORN, M. B.; ROBERTS, A. B.; GOOGMAN, D. S. (editors). **The retinols, biology, chemistry and medicine**. 2.ed. New York :Raven Press, p.387-441, 1994

HIDALGO, C.; DÍEZ, C.; DUQUE, P.; FACAL, N.; PRENDES, J. M.; FERNÁNDEZ, I. GÓMEZ, E. Improved cumulus-oocyte complex yields from heifers treated with retinol. **Theriogenology**, v.57, p.672, 2002.

JURISICOVA, A.; VARMUZA, S.; CASPER, R. F. Programmed cell death and human embryo fragmentation. **Molecular Human Reproduction**, v.2, p.93-98, 1996.

KALTER, H.; WARKANY, J. Experimental production of congenital malformations in mammals by metabole procedure. **Physiology Reviews**, n.39, p.69-115, 1959.

LIMA, P. F.; OLIVEIRA, M.A.L.; GONÇALVES, P. B. D.; MONTAGNER, M. M.; REICHENBACH, H-D.; WEPPERT, M.; CAVALCANTI NETO, C. C.; PINA, V. M. R.; SANTOS, M. H. B. Effects of retinol on the *in vitro* development of *Bos indicus* embryos to blastocysts in two different culture systems. **Reproduction in Domestic Animal**, v.39, p.356-360, 2004.

LIMA, P. F.; OLIVEIRA, M.A.L.; SANTOS, M. H. B.; REICHENBACH, H-D.; WEPPERT, M.; PAULA-LOPES, F.; CAVALCANTI NETO, C.C.; GONÇALVES, P. B. D. 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.

MEM, H.; MONSON, R. L.; PARRISH, J. J.; RUTLEDGE, J. J. Degeneration of cryopreserved bovine oocytes via apoptosis during subsequent culture. **Cryobiology**, v.47, p.73–81, 2003.

MOHAN, M.; MALAYER, J. R.; GEISERT, R. D.; MORGAN, G. L. Expression of retinol-binding protein messenger RNA and retinoic acid receptors in preattachment bovine embryos. **Molecular Reproduction Development**, n.60, p. 289-92, 2001.

MORITA, Y.; TILLY J. L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. **Development and Biology**. v.213, p.1-17, 1999.

MONTAGNER, M. M. Production of bovine embryo in vitro using frozen-thawed media, HEPES and retinol. 1999. 68p. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria.

NAPOLI, J. L. Biosynthesis and metabolism of retinoic acid: roles of CRBP and homeostasis. **Journal of Nutrition**, n.123, p. 362-66, 1993.

PEREZ, G. I.; TAO, X. J.; TILLY, J. L. Fragmentation and death (a.k.a. apoptosis) of ovulated oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v.5, p.414–420, 1999.

SAS. User's Guide. SAS Inst., Cary: SAS, NC.1989.

SHAW, D. W.; FARIN, P. W.; WASHBURN, S. P.; BRITT, J. H. Effect of retinol palmitate on ovulation rate and embryo quality in superovulated cattle. **Theriogenology**, n.44, p.51-58, 1995.

SHOUKIR, Y.; CAMPANA, A.; FARLEY, A; SAKKAS, D. Early cleavage of *in vitro* fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. **Human Reproduction**, v.12, p.1531-1536, 1997.

TILLY, J. L. Commuting the death sentence: how oocyte strive to survive. **Nature Rev Molecular Cell Biology**. v.2, p.838-848, 2001.

VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.; DE KRUIF, A. Relationship between timing of development, morula morphology and cell allocation to the inner cell mass and trophectoderm *in vitro* produced embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.47, p.47-56, 1997.

CAPÍTULO 2

O tratamento de oócitos com retinóides e o de embriões com retinóides e fator de crescimento inibe a apoptose e favorece a produção *in vitro* de embriões?

(Treated oocytes with retinoids and embryos with retinoids and growth factor improve the in vitro embryos production and inhibit the apoptosis?)

JC Conceição¹; RM Chaves²; ER Santos Junior¹; JDR Alves¹; FF Paula-Lopes³; PBD Gonçalves⁴; PF Lima¹; MAL Oliveira^{1(*)}

¹Laboratório de Biotécnicas Reprodutivas do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900 Recife-PE/Brasil.

²Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual do Maranhão, São Luis-MA/Brasil.

³Universidade Federal de São Paulo, São Paulo-SP/Brasil.

⁴Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS/Brasil.

* Author for corresponding: maloufrpe@uol.com.br

Resumo

Objetivou-se avaliar, *in vitro*, o efeito da adição do retinol (RT) e do ácido retinóico (AR) ao meio de maturação de oócitos e de ambos os retinóides e do IGF-1 ao meio de desenvolvimento de embriões caprinos para favorecer a produção *in vitro* de blastocistos e inibir a apoptose aferida pela atividade das enzimas caspases do grupo II e da fragmentação de DNA pelo teste de TUNEL. Os ovários foram obtidos em abatedouro e transportados ao laboratório em solução fisiológica aquecida a 30°C. Os oócitos (n = 4320) foram coletados de folículos medindo de 2 a 6 mm de diâmetro por

aspiração com agulha acoplada a seringa. Os oócitos, testados em 10 repetições, foram inicialmente lavados em meio próprio, posteriormente selecionados e distribuídos nas gotas do meio TCM 199 suplementado com RT ou com AR, para finalmente serem incubados a 39°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ durante 24 horas. Ao final deste período, os oócitos foram processados em meio mDM e expostos aos espermatozóides por 18 horas na mesma condição atmosférica mencionada. Posteriormente, os presumíveis zigotos foram depositados nas gotas do meio KSOM enriquecido com RT, AR ou IGF-I isoladamente ou de forma associada entre si, além da monocamada de células do oviduto. Finalmente foram incubados a 39°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ durante dez dias. Ao final do 10^o dia da co-cultura os blastocistos foram preparados para localização das alterações características da apoptose, utilizando-se o reagente PhiPhiLux-G1D2 para determinação da atividade das enzimas caspases do grupo II e as soluções de paraformaldeído a 4% e de *Phosphate-Buffered Saline* + 1 mg/mL de *Polivinilpirrolidona* para determinação do número de blastômeros positivos para apoptose através da reação do ensaio de TUNEL (fragmentação do DNA). Os resultados mostraram que os grupos de oócitos e embriões tratados somente com retinóides produziram menor número de blastocistos ($P < 0,05$) do que nos grupos de oócitos e embriões tratados com retinóides associados ao IGF-I. Quanto aos blastocistos positivos para apoptose, seja avaliada pela atividade das enzimas caspases ou pela fragmentação do DNA, não foi verificada diferença ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais. Os resultados permitem concluir que a associação dos retinóides com o IGF-I é benéfica e pode ser recomendada para maximizar a produção *in vitro* de blastocistos caprinos, mas não inibe a apoptose.

Palavras-chave: retinol, ácido retinóico, IGF-I, MIV, FIV, blastocisto.

ABSTRACT

The objective was to evaluate in vitro the effect of adding retinol (RT) and retinoic acid (RA) in half and maturation of oocytes of both retinoids and IGF-1 in the middle of developing goat embryos to foster blastocyst production in vitro and inhibit apoptosis measured by enzyme activity of group II caspases and DNA fragmentation by TUNEL assay. Ovaries were obtained from a slaughterhouse and transported to the laboratory in warm saline at 30 ° C. The oocytes (n = 4320) were collected from follicles measuring 2-6 mm in diameter by aspiration with a syringe needle attached. The oocytes, tested in 10 replicates, were initially washed in medium itself, then screened and distributed in droplets of TCM 199 supplemented with RT or with RA, before finally being incubated at 39 ° C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 24 hours. Thereafter, oocytes were processed through mDM and exposed to sperm for 18 hours in the same atmospheric conditions mentioned. Subsequently, presumptive zygotes were placed in droplets of KSOM medium supplemented with RT, RA, or IGF-I alone or in association with each other beyond the monolayer of cells of the oviduct. Finally they were incubated at 39 ° C in humid atmosphere with 5% CO₂ during ten days. At the end of the 10th day of co-culture blastocysts were prepared for localization of the changes characteristic of apoptosis, using the reagent PhiPhiLux-G1D2 for determination of enzyme activity caspases group II and solutions of 4% paraformaldehyde and Phosphate-Buffered Saline + 1 mg / mL of polyvinylpyrrolidone to determine the number of blastomeres positive for apoptosis by TUNEL reaction test (DNA fragmentation). The results showed that the groups of oocytes and embryos treated only with retinoids produced fewer number of blastocysts (P <0.05) than in groups of oocytes and embryos

treated with retinoids associated with IGF-I. As to the blastocyst positive for apoptosis, is assessed by the activity of enzymes caspases or DNA fragmentation, there was no difference ($P > 0.05$) between groups. The results suggest that the combination of retinoids with IGF-I is beneficial and can be recommended to maximize production *in vitro* blastocyst goats, but does not inhibit apoptosis.

Key words: retinol, retinoic acid, IGF-I, IVM, IVF, blastocyst.

Introdução

Bioteχνologias reprodutivas, como a produção *in vitro* (PIV) de embriões, têm sido empregadas para melhorar o desempenho reprodutivo de fêmeas com alto valor genético. Portanto, ela representa uma ferramenta importante para acelerar o melhoramento genético dos animais zootecnicamente importante (PEIPPO et al., 2001).

O sucesso da FIV está diretamente relacionado com uma perfeita maturação nuclear e citoplasmática de oócitos incubados em ambiente adequado (TSAFRIRI e ADASHI, 1994). As percentagens de desenvolvimento embrionário obtidas com o cultivo *in vitro* de embriões produzidos por MIV e FIV permanecem menores que os processos *in vivo* (PARRISH, 1991). Em caprinos, Ongerl et al. (2001) demonstraram que tal fato deve-se a deficiência dos meios utilizados na produção dos embriões (maturação, fecundação e cultivo) que, além de prejudicarem as etapas anteriores, promovem o bloqueio do desenvolvimento, inviabilizando o embrião, ainda que os aspectos morfológicos pareçam estar preservados.

Aumentos na incidência de morte celular são um importante indicador de um ambiente inadequado para o oócito e embrião tanto *in vivo* como *in vitro* (BETT e KING, 2001). A adição de vitaminas ao meio de cultivo é recente e tem como finalidade elevar a qualidade da produção *in vitro* de embriões. Dentre as vitaminas pesquisadas

para esta finalidade, a vitamina A tem despertado maior interesse pelo profundo efeito sobre a morfogênese embrionária, crescimento e diferenciação celular, visão e reprodução (HOFMANN e EICHELE, 1994).

Por outro lado, a presença de receptores para fatores de crescimento e citocinas nos embriões e no trato reprodutivo de mamíferos indica que essas substâncias podem contribuir de forma positiva na fisiologia embrionária e conseqüentemente no processo de produção *in vitro* de embriões de ruminantes (SARGENT et al., 1998).

Diante do exposto, este estudo teve o objetivo de avaliar se a suplementação do meio de maturação de oócitos com retinóides e o de desenvolvimento embrionário com retinóides associados ao IGF-I otimiza a produção *in vitro* de embriões da espécie caprina, inibindo a apoptose e aumentando o número de blastocistos .

Material e Métodos

Os ovários de caprinos foram obtidos em abatedouro da Região Metropolitana do Recife. No período máximo de uma hora, os ovários foram transportados ao laboratório em garrafa térmica contendo solução fisiológica a 30°C acrescida de 30 µg/mL de sulfato de gentamicina.

Os oócitos (n = 4320), aspirados com agulha 18 G acoplada a seringa de 5 mL, foram coletados de folículos medindo de 2 a 6 mm de diâmetro e o conteúdo folicular foi depositado em cálice contendo o Meio de Lavagem constituído por 8,0 mg de bicarbonato de sódio, 45,0 mg de glucose, 5,6 mg de piruvato de sódio, 11,9 mg de HEPES, 2,5 mg de sulfato de gentamicina e 20,0 mg de álcool polivinílico em 50 mL de TALP.

Para sedimentação e obtenção do complexo *cumulus oócito* (CCO), o líquido folicular permaneceu em repouso durante 15 minutos a 39°C. Após desprezar o sobrenadante, os CCOs foram depositados em placa de Petri para recuperação e seleção dos oócitos. Após seleção, com base na classificação morfológica descrita por Gonçalves et al. (2008), os oócitos foram lavados (5 vezes) no Meio de Lavagem para em seguida serem aleatoriamente distribuídos (25 oócitos) em gotas de 100 µL do meio de maturação (TCM-199) cobertas com óleo de parafina esterilizada.

Em todos os grupos experimentais foi utilizado o TCM-199 suplementado com 50 µg/mL de piruvato de sódio, 2,6 mg/mL de bicarbonato de sódio, 50 µg/mL de sulfato de gentamicina, 5,0 µg/mL de FSH/LH (Pluset[®]) e 1 mg/mL de álcool polivinílico. Dependendo do grupo experimental, os oócitos foram tratados com 0,3 µM de retinol (RT) ou com 0,5 µM de ácido retinóico (AR) e incubados a 39°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ durante 24 horas. Ao final da MIV e após avaliação da morfologia e da expansão das células do *cumulus*, os oócitos foram processados e destinados para a FIV.

A FIV foi realizada utilizando-se sêmen fresco, conforme recomendação de Cavalcanti Neto (2004). Cuidadosamente, 0,1 mL de sêmen foi depositado em tubos cônicos de centrífuga contendo 1,5 mL do meio definido modificado (mDM), segundo Keskinetepe et al. (1998), o qual foi constituído de 0,1250 g de glucose, 0,1552 g de bicarbonato de sódio, 0,0069 g de piruvato de sódio, 0,0500 g de álcool polivinílico, 0,0500 g de cafeína e 0,0250 g de penicilamina em 50 mL de mDM. Posteriormente, foram inclinados em ângulo de 45° com a finalidade de se obter a migração espermática ascendente. Decorridos 45 minutos, 0,8 mL da parte superior de cada tubo foi aspirada e centrifugada a 350 G por 10 minutos. Descartado o sobrenadante, 200 µL do meio

mDM contendo 10 µg/mL de heparina foi acrescentado a 200 µL do pellet resultante da centrifugação.

Antes da exposição aos espermatozoides, os oócitos foram avaliados quanto à morfologia e somente aqueles que apresentaram boa expansão das células do *cumulus* foram lavados no meio Definido Modificado (mDM). Posteriormente, foram transferidos (25 oócitos) para as gotas de 150 µL do mDM sob óleo de parafina esterilizada, local onde foi depositada a suspensão espermática na concentração final de $2,0 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Os gametas foram incubados em condições atmosféricas idênticas aquelas da MIV durante o período de 18 horas.

Os presumíveis zigotos, em dez replicações, foram distribuídos em dez grupos (G) experimentais. Após serem mecanicamente desnudados e transferidos para as gotas de 100 µL contendo o Potassium Simplex Optimized Medium (KSOM) constituído por 85,15 mM de cloreto de sódio, 8 mM de cloreto de potássio, 2 mM de cloreto de cálcio, 0,5 mM de cloreto de magnésio, 25 mM de bicarbonato de sódio, 5 mM de lactato de sódio, 0,5 mM de piruvato de sódio, 2 mM de glucose, 4,9 mM de glicina e 0,1 mM de glutamina, além da monocamada de células de oviduto (MCO). Estas células foram assepticamente obtidas em matadouro e que foram preparadas conforme técnica utilizada no Laboratório de Biotécnicas da Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE. Decorridas 48 horas de incubação, as estruturas que não clivaram foram removidas e 30% do meio foi parcialmente renovado, permanecendo assim por mais dez dias.

No G1, os oócitos, zigotos e embriões foram tratados com RT (TCM-199+RT/KSOM+RT+MCO). No G2, os oócitos foram tratados com RT e os zigotos e embriões com IGF-1 (TCM-199+RT/KSOM+IGF-I+MCO). No G3, os oócitos foram tratados com RT e os zigotos e embriões com RT e IGF-1 (TCM-

199+RT/KSOM+RT+IGF-I+MCO). No G4, os oócitos, zigotos e embriões foram tratados com AR (TCM-199+AR/KSOM+AR+MCO). No G5, os oócitos foram tratados com AR e os zigotos e embriões com IGF-1 (TCM-199+AR/KSOM+IGF-1+MCO). No G6, os oócitos foram tratados com AR e os zigotos e embriões com AR e IGF-1 (TCM-199+AR/KSOM+AR+IGF-I+MCO). No G7, os oócitos foram tratados com RT e os zigotos e embriões com AR (TCM-199+RT/KSOM+AR+MCO). No G8, os oócitos foram tratados com RT e os zigotos e embriões com AR e IGF-1 (TCM-199+RT/KSOM+AR+IGF-I+MCO). No G9, os oócitos foram tratados com AR e os zigotos e embriões com RT (TCM-199+AR/KSOM+RT+MCO). No G10, os oócitos foram tratados com AR e os zigotos e embriões com RT e IGF-1 (TCM-199+AR/KSOM+RT+IGF-I+MCO).

Durante o co-cultivo de dez dias foi averiguado o número de clivagens no 3^o dia e o de blastocisto no 10^o dia. Neste último dia foi determinada a atividade da enzima caspases do grupo II e o número de blastômeros positivos para apoptose através da reação do ensaio de TUNEL (fragmentação do DNA).

A determinação da atividade das enzimas caspases do grupo II foi aferida submetendo-se as amostras (n = 100) a três vezes lavagens em gotas de 100 µL de Phosphate-Buffered saline (PBS) - 1 mg/mL de Polivinilpirrolidona (PVP) e incubadas em gotas de 25 µL de PBS-PVP contendo 5 µM de Phiphilux-G1D2, por 40 minutos, a 39°C protegido da luz. Em seguida as amostras foram lavadas em PBS-PVP e a atividade enzimática da caspase foi determinada com microscópio de fluorescência.

O ensaio de TUNEL foi realizado desnudando e fixando as amostras (n = 100) em 100 µL da solução de 4% de paraformaldeído por uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes em 100 µL de PBS-PVP e incubados em 100 µL de meio de permeabilização (0,5% de Triton X-100 contendo

0,1% de citrato de sódio) por uma hora. Após a permeabilização, as amostras foram armazenadas a 4°C até a realização do ensaio de TUNEL. No dia do teste de TUNEL, as amostras foram lavadas, três vezes, em gotas de 100 µL PBS-PVP e incubados em 15 µL da mistura de enzima terminal deoxynucleotidyl transferase (TUNEL) por uma hora a 37°C. Posteriormente, as amostras foram lavadas em PBS-PVP e incubadas com o corante de DNA-DAPI por 15 minutos para novamente serem lavadas em gotas de 100 µL de PBS-PVP, transferidos para lâminas cobertas com lamínula e levadas para avaliação em microscópio de fluorescência. Essas técnicas foram conduzidas de acordo com aquelas utilizadas por Paula-Lopes e Hansen (2002ab), bem como por Roth e Hansen (2004).

Utilizou-se a análise de variância pelo método dos quadrados mínimos através do procedimento PROC GLM (para variáveis fixas) e PROC MIXED (para variáveis fixas e aleatórias) do pacote estatístico SAS (SAS, 1989). Os dados foram previamente avaliados quanto às premissas para análise de variância (homogeneidade das variáveis e normalidade dos resíduos). As variáveis dependentes e independentes foram estabelecidas de acordo com o delineamento de cada etapa do experimento. Os modelos estatísticos usados incluíram os efeitos principais e todas as possíveis interações. Foi considerado o nível de 5% de significância.

Resultados

A Tabela 1 contém os valores médios dos embriões que alcançaram o estágio de blastocisto. Independentemente de qual retinóide foi utilizado no meio de maturação *in vitro* dos oócitos, registrou-se maior produção ($P < 0,05$) de blastocistos naqueles grupos (G2, G3, G5, G6, G8, G10) em que o meio de desenvolvimento embrionário foi

acrescido do fator de crescimento similar à insulina. Entre os grupos tratados apenas com ambos os retinóides (G1, G4, G7, G9) não foi verificada diferença ($P > 0,05$).

Tabela 1: Média e desvio padrão ($\bar{x} \pm s$) de blastocistos caprinos previamente tratados com retinol (RT) e ácido retinóico (AR) na maturação *in vitro* de oócitos, bem como com retinol (RT), ácido retinóico (AR) e fator de crescimento (IGF-I) na co-cultura *in vitro* com monocamada de células de oviduto (MCO).

Grupos	T r a t a m e n t o s		Estádio Embrionário
	Maturação <i>in vitro</i>	Co-cultura <i>in vitro</i>	Blastocisto ($\bar{x} \pm s$)
G 1	TCM-199+RT	KSOM+RT+MCO	6,3±0,93 ^a
G 2	TCM-199+RT	KSOM+IGF-I+MCO	7,0±1,15 ^{bc}
G 3	TCM-199+RT	KSOM+RT+IGF-I+MCO	7,9±1,19 ^{bc}
G 4	TCM-199+AR	KSOM+AR+MCO	6,4±1,37 ^{ad}
G 5	TCM-199+AR	KSOM+IGF-I+MCO	7,0±1,08 ^{bc}
G 6	TCM-199+AR	KSOM+AR+IGF-I+MCO	7,8±0,84 ^{bc}
G 7	TCM-199+RT	KSOM+AR+MCO	6,8±0,63 ^{ad}
G 8	TCM-199+RT	KSOM+AR+ IGF-I+MCO	7,9±0,66 ^{bc}
G 9	TCM-199+AR	KSOM+RT+MCO	6,7±0,69 ^{ad}
G 10	TCM-199+AR	KSOM+RT+IGF-I+MCO	7,9±1,08 ^{bc}

Letras diferentes (ab, cd) na mesma coluna significa diferença ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

TCM-199: meio de maturação de oócitos.

KSOM: meio de desenvolvimento embrionário.

Na Figura 1 constam os valores médios concernentes aos blastocistos positivos para apoptose diagnosticado pela fragmentação do DNA através do teste de TUNEL. Não foi constatada diferença ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais.

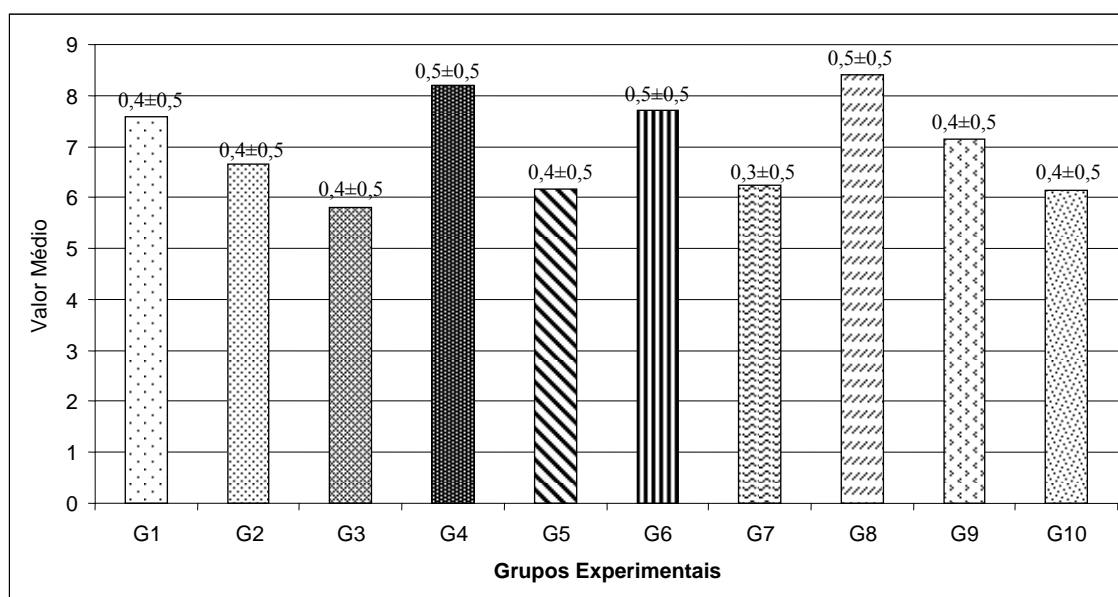


Figura 1: Média e desvio padrão de blastocistos caprinos TUNEL-positivo. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais.

Na Figura 2 estão contidos os valores médios de blastocistos positivos para a apoptose diagnosticado pela atividade das enzimas caspases do grupo II. Não foi registrada diferença ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais.

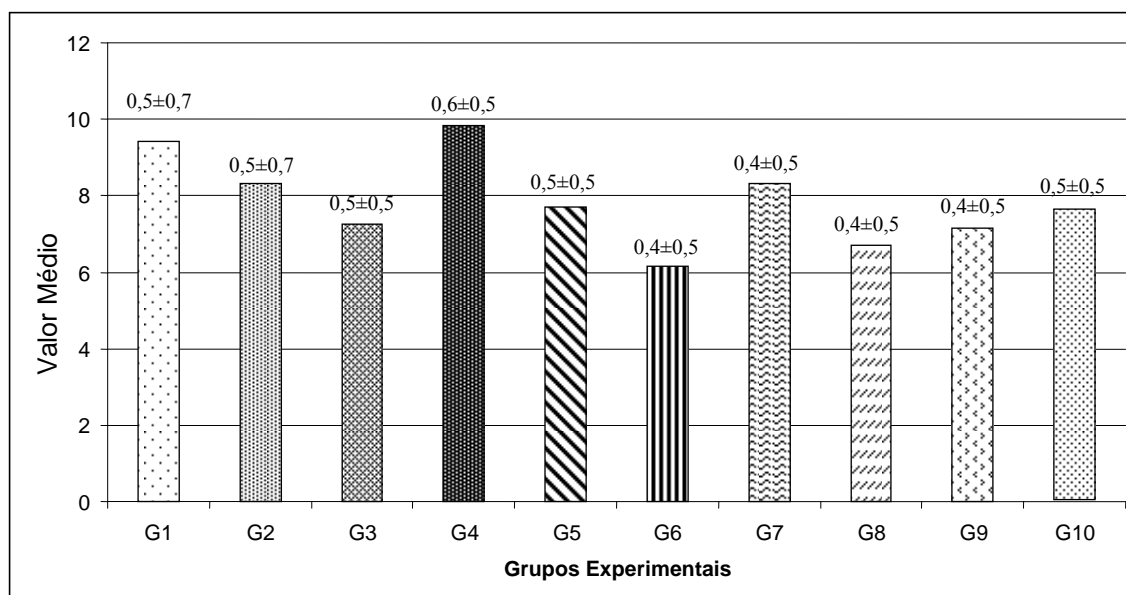


Figura 2: Média e desvio padrão de blastocistos caprinos positivos para atividade das enzimas caspases. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais.

Discussão

Em bovinos, os benefícios do RT e do AR sobre a maturação de oócitos e o desenvolvimento embrionário foram relatados por Lima et al. (2004/2006). Em caprinos, o aumento da PIV de embriões foi claramente observado após a adição de ambos os retinóides aos meios de maturação de oócitos e de cultivo de embriões, especialmente quando em combinação com IGF-I. Estes resultados corroboram os achados de Chiamenti et al. (2010) que também não adicionaram soro sanguíneo ao meio de cultivo. Em outro experimento com adição de soro sanguíneo ao meio de maturação de oócitos, Cavalcanti Neto (2004) não observou qualquer influência do RT e do AR sobre a MIV de oócitos caprinos e na oportunidade sugeriu que os meios suplementados com soro sanguíneo poderiam ter mascarado o efeito dos retinóides.

É importante também considerar a benéfica influência do IGF-I sobre a PIV de embriões, especialmente quando é utilizado o sistema de co-cultura (HERRLER et al., 1992). O desenvolvimento de mórulas aumentou de 33% para 45% após a adição de

IGF-I ao meio de desenvolvimento embrionário (MATSUI et al., 1995) e o de blastocisto de 11 para 17% (PRELLE et al., 2001).

O principal problema dos embriões decorrentes da PIV é a diferença de qualidade com os produzidos *in vivo*, fazendo-se necessário implantar um sistema efetivo de avaliação da qualidade embrionária. O desenvolvimento embrionário (HOLM et al., 1999) e a apoptose observada no processo de cultivo (BYRNE et al., 1999) são critérios funcionais para avaliar a qualidade dos embriões. A apoptose embrionária ocorre mesmo que as condições da PIV sejam adequadas (SOOM et al., 2000), afirmação corroborada neste estudo tendo em vista que as células dos blastocistos sofreram apoptose. O valor médio de $0,6 \pm 0,5$ de blastocistos produzidos neste estudo mostrou-se positivos para apoptose, seja através da fragmentação do DNA ou da atividade das enzimas caspases do grupo em um ou mais blastômeros.

Em média, o número de embriões positivos para a atividade das enzimas caspases do grupo II dos blastocistos não foi influenciado pela adição de IGF-I ao meio de desenvolvimento embrionário. Esta constatação é apoiada no estudo de Watson et al. (2000), onde o fator de crescimento IGF-I não exerceu influência sobre o número de células apoptóticas, embora tenha aumentado o número de blastocisto.

Os valores médios de blastocistos positivos para teste de TUNEL variaram de $0,4 \pm 0,5$ a $0,5 \pm 0,5$, independentemente de terem sido produzidos em meio de cultivo contendo retinóides associados ou não ao IGF-I. Estes dados são compatíveis com os resultados de Byrne et al. (1999) e Watson et al. (2000) utilizando embriões bovinos originados da PIV. O fato de não existir diferença entre os grupos tratados com retinóides associados ou não ao IGF-1 no presente estudo pode ser justificado de acordo com Byrne et al. (1999) ao encontrarem células com morfologia fragmentada e negativas para o teste de TUNEL.

Neste trabalho, a expectativa inicial era de que o IGF-I contribuísse significativamente para reduzir a porcentagem de blastocistos positiva para a apoptose, todavia, os resultados evidenciaram que a associação do IGF-I com ambos os retinóides é benéfica e pode ser recomendada para maximizar a PIV de blastocistos caprinos, mas não é suficiente para inibir a apoptose. Assim, outros estudos avaliando os efeitos das adições de IGF-I e retinóides aos meios de maturação *in vitro* e de desenvolvimento embrionário deverão adicionar subsídios sobre as implicações na qualidade de embriões produzidos da espécie caprina.

Referências

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

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

CAVALCANTI NETO, C. C. Uso do retinol na produção *in vitro* de embriões caprinos. 113p. 2004. **Tese** (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Minas Ferais.

CHIAMENTI, A. Adição de retinóides e de fator de crescimento IGF-I aos meios de maturação de oócitos e de desenvolvimento *in vitro* de embriões caprinos. 132p. 2007. **Tese** (Doutorado em Ciência Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária. Universidade Federal Rural de Pernambuco.

CHIAMENTI, A.; [AGUIAR FILHO, C. R. DE](#); [FREITAS NETO, L. M.](#); [CHAVES, R. M.](#); [PAULA-LOPES, F.](#); [LIMA, P. F. DE](#); [GONÇALVES, P. B. D.](#); OLIVEIRA, M. A.

L. Effects of retinoids on the *in vitro* development of *Capra Hircus* embryos to blastocysts in two different culture systems. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 68-72, 2010.

DUQUE, P.; GÓMEZ, E.; HIDALGO, C.; FACAL, N.; FERNÁNDEZ, I.; DÍEZ, C. Retinoic acid during *in vitro* maturation of bovine oocytes promotes embryonic development and early differentiation. **Theriogenology**, n.57, p.364, 2002.

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

HOFMANN, C.; EICHELE, G. Retinoids in development. In: SPORN, M. B.; ROBERTS, A. B.; GOOGMAN, D. S. (editors). **The retinols, biology, chemistry and medicine**. 2ª Ed. New York: Raven Press, p.387-441, 1994

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

LIMA, P. F. Utilização de retinóides e fator de crescimento na produção *in vitro* de embriões bovinos. 123p. 2004. **Tese** (Doutorado em Ciência Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

LIMA, P. F.; OLIVEIRA, M.A.L.; GONÇALVES, P. B. D.; MONTAGNER, M. M.; REICHENBACH, H-D.; WEPPERT, M.; CAVALCANTI NETO, C. C.; PINA, V. M. R.; SANTOS, M. H. B. Effects of retinol on the *in vitro* development of *Bos indicus* embryos to blastocysts in two different culture systems. **Reproduction in Domestic Animal**, v.39, p.356-360, 2004.

LIMA, P. F.; OLIVEIRA, M.A.L.; SANTOS, M. H. B.; REICHENBACH, H-D.; WEPPERT, M.; PAULA-LOPES, F.; CAVALCANTI NETO, C.C.; GONÇALVES, P.

B. D. 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.

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*. **Journal of Veterinary Medicine and Science**. n.57, p.1109-1111, 1995.

NAPOLI, J. L. Biosynthesis and metabolism of retinoic acid: roles of CRBP and homeostasis. **Journal of Nutrition**, n.123, p. 362-66, 1993.

ONGERI, E. M.; BORMANN, C. L.; BUTLER, R. E. *et al.* Development of goat embryos after *in vitro* fertilization and parthenogenetic activation by different methods. **Theriogenology**, v. 55, p. 1933-1945, 2001.

PARRISH, J. J. Application of *in vitro* fertilization to domestic animals. In: Wassarmen, P.M.. **Elements of mammalian fertilization**. Boca Raton: CRC press, cap. 3, p. 111-132. 1991.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN P. J. Apoptosis is an adaptative response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. **Biochemical and Biophysical Research Communicator**. v.295, p.37-42, 2002a.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN P. J. Heat Shock-Induced Apoptosis in Preimplantation Bovine Embryos. Is a Developmentally Regulated Phenomenon. **Biology of Reproduction**, v.66, p.1169-1177, 2002b.

PEREZ, G. I.; TILLY, J. L. *Cumullus* cells are required for the increased apoptotic potential in oocytes of aged mice. **Human Reproduction**, v.12, p.2781-2783, 1997.

PEIPPO, J.; KURKILAHTI, M.; BREDBACKA, P. Developmental kinetics of *in vitro* produced bovine embryos: the effect of sex, glucose and exposure to time-lapse environment. **Zygote**, v.9, p.105-113, 2001.

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.1309-1316, 2001.

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

SARGENT, I. L.; MARTIN, K. L.; BARLOW, D. H. The use of recombinant growth factors to promote human embryo development in serum-free medium. **Human Reproduction**, v.13, Suppl n.4, p.239-48, 1998.

SAS. **User's Guide**. SAS Inst., Cary: SAS, NC.1989

SOOM, A. V.; VANROOSE, G.; LAEVENS, H.; KRUIF, A. D. Apoptosis *in vitro* produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.53, p.367, 2000.

TSAFRIRI, A.; ADASHI, E. Local nonsteroidal regulators of ovarian function. In: Knobil, E., Neill, J. **The Physiology of reproduction**. New York: Raven Press, cap. 15, p. 817-861, 1994

WATSON, A. J.; DE SOUSA, P.; CAVENEY, A.; BARCROFT, L. C.; NATALE, D.; URQUHART, J.; WESTHUSIN, M. E. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. **Biology of Reproduction**, v.62, p.355–364, 2000.