

RITA DE KÁSSIA OLIVEIRA DE ANDRADE

**EFEITO DE DIFERENTES MEIOS SOB A MATURAÇÃO E
CLIVAGEM DE OÓCITOS CAPRINOS**

GARANHUNS

2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E
REPRODUÇÃO DE RUMINANTES**

RITA DE KÁSSIA OLIVEIRA DE ANDRADE

**EFEITO DE DIFERENTES MEIOS SOB A MATURAÇÃO E
CLIVAGEM DE OÓCITOS CAPRINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu
Co-orientador: Dr. Antônio Santana dos Santos Filho

GARANHUNS

2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E
REPRODUÇÃO DE RUMINANTES**

**EFEITO DE DIFERENTES MEIOS SOB A MATURAÇÃO E
CLIVAGEM DE OÓCITOS CAPRINOS**

Dissertação elaborada por

RITA DE KÁSSIA OLIVEIRA DE ANDRADE

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. CLÁUDIO COUTINHO BARTOLOMEU

Orientador – Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Dr. ANTÔNIO SANTANA DOS SANTOS FILHO

Coorientador - Instituto Agronômico de Pernambuco – IPA

Prof. Dr. ANDRÉ MARIANO BATISTA

Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E
REPRODUÇÃO DE RUMINANTES**

**EFEITO DE DIFERENTES MEIOS SOB A MATURAÇÃO E
CLIVAGEM DE OÓCITOS CAPRINOS**

Dissertação elaborada por
RITA DE KÁSSIA OLIVEIRA DE ANDRADE

Aprovada em 02/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu
Presidente da Banca – Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE

Dr. Antônio Santana dos Santos Filho
Instituto Agronômico de Pernambuco – IPA

Prof. Dr. André Mariano Batista
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

DEDICO

Àquela que é o amor da minha vida, minha filha
Eliza

Nenhum trabalho é feito sem a colaboração de outras pessoas. Neste percurso, às vezes a vida nos impõe barreiras, que para serem transpostas, necessitam de apoio, paciência, ânimo e força. Quando transpostas agradecemos todo o esforço e sentimo-nos gratificados por termos pessoas assim, muito especiais, que a partir deste momento farão parte de nossa vida. Por isso, agradeço.

A Deus, que está sempre presente delineando os nossos caminhos e cuidando dia após dia, para não tropeçarmos frente às dificuldades e aos problemas que por sua vez a vida nos empoeira.

A minha iluminada e amada filha Eliza por ter mim ensinado que não importa tão árdua seja a batalha, a esperança deve prevalecer, a luta deve existir e o desespero sumir.

Aos familiares, que de forma incontestável, é o alicerce da nossa vida, pois nos apóiam nas horas difíceis com afeto e dedicação, para que não nos tornemos sem forças durante a caminhada, mas sim cheios de esperança, sempre com dignidade a jornada da vida.

Aos meus queridos pais, Maria José de Oliveira e Gabriel Vieira de Andrade, pelo exemplo de vida, pelo amor, pelo incentivo e por tudo que sempre fizeram por mim.

Aos meus irmãos que são uma dádiva na minha vida, obrigado por tudo.

Ao meu esposo, pelo companheirismo, paciência e força durante toda a jornada, muito obrigada por tudo que fez e faz por mim.

Aos mestres, são os verdadeiros responsáveis pela nossa vitória, estimuladores do nosso crescimento, dedico minha sincera homenagem e eterna gratidão a todos.

Ao meu orientador Prof^o. Dr. Cláudio Coutinho, pessoa admirável por quem tenho um enorme respeito e consideração, muito obrigada pela oportunidade e pela orientação.

Ao meu Co-orientador Dr. Antônio Santana, um ser humano incrível, presente e sempre disposto a ajudar, muito grata por tudo.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes.

A Estação Experimental do IPA em Arcoverde, ao Dr. Júlio Oliveira, pela viabilização do laboratório. E a todos os trabalhadores que a compõem.

Às amigas, Bete, Aninha; minhas irmãs do coração muito obrigado por tudo amo vocês.

A amiga Maiana, muito grata pela oportunidade, incentivo e apoio durante a entrada no mestrado.

Ao colega Wasim, muito grata pela ajuda durante o experimento, e pelo exemplo de guerreiro que é, não importa quão difícil seja uma situação sempre haverá a oportunidade de luta e esperança de dias melhores.

Aos familiares de minha amiga Bete, Dona Eliene, seu João, Elaine e Vinicius, muito grata pelo acolhimento em seu lar, e pelo exemplo de pessoas batalhadoras e humildes que são.

A professora de graduação Tatiane Rodrigues grata por todos os ensinamentos.

RESUMO

O presente estudo objetivou verificar a maturação e posterior clivagem de embriões caprinos as 26 horas, no Tratamento 1 (T1): Base TCM 199 + NaHCO₃ + LH (5 mg/mL) + FSH (1 µg/mL) + Sulfato de amicacina (83,4 µg/mL) + Piruvato (22 µg/mL) + 10% SFB; Tratamento 2 (T2): Base TCM 199 + NaHCO₃ + EGF (0,52 µg/mL) + Cysteamina (10 ng/mL) + Gentamicina (57 µg/mL), e Tratamento 3 (T3): Base TCM 199 + NaHCO₃ + EGF (0,52 µg/mL) + Cysteamina (10 ng/mL) + Gentamicina (57 µg/mL) + Cysteina (10 ng/mL) + Acido Ascórbico (100 ng/mL); sendo o experimento dividido em duas etapas. A primeira, verificando o estágio de maturação nuclear e, na segunda, se houve clivagem dos oócitos ou não, maturados fertilizados com uma dose de 2×10^6 /mL de espermatozóides, sendo após 18 horas verificada a clivagem. Após 26 horas de maturação, o estágio que ocorreu em maior proporção nos três tratamentos (T1: 61,06; T2: 63,06 e T3: 64,36%) foi a metáfase II, com porcentagens similares ($p > 0,05$) entre os tratamentos, assim como para todos os estágios de divisão nuclear. Do mesmo modo, a taxa de clivagem de oócitos (T1: 34,16; T2: 33,33 e T3: 32,51%), demonstraram valores similares ($p > 0,05$) entre tratamentos. Conclui-se que os três tratamentos fornecem ambiente propício para maturação de oócitos caprinos.

Palavras-chave: PIVE, caprinos, meio de maturação.

ABSTRACT

The present study aimed to verify the maturation and subsequent cleavage of goat embryos after 26 hours in Treatment 1 (T1): Base TCM 199 + NaHCO₃ + LH (5 mg/mL) + FSH (1 µg/mL) + Amicacin Sulfate (83.4 µg/mL) + Pyruvate (22 µg/mL) + 10% SFB; Treatment 2 (T2): Base TCM 199 + NaHCO₃ + EGF (0.52 µg/mL) + Cysteamine (10 ng/mL) + Gentamicin (57 µg/mL), and Treatment 3 (T3): Base TCM 199 + NaHCO₃ + EGF (0.52 µg/mL) + Cysteamine (10 ng/mL) + Gentamicin (57 µg/mL) + Cysteine (10 ng/mL) + Ascorbic acid (100 ng/mL); with an experiment divided in two stages. The first aimed to verify the nuclear maturation, and the second if the oocytes matured were fertilized with a dose of 2×10^6 / mL spermatozoa, and the cleavage percentage was observed. After 26 hours of maturation, the highest proportion stage that occurred over the treatments was Metaphase 2 (T1: 61.06, T2: 63.06 and T3: 64.36%), with similar percentages ($p > 0.05$) between treatments, as well as for all stages of nuclear division. Similarly, the oocyte cleavage rate (T1: 34.16, T2: 33.33 and T3: 32.51%), showed similar values ($p > 0.05$) between treatments. It can be concluded that all three treatments provide a favorable environment for maturation of goat oocytes.

Key words: PIVE, goats, maturation medium.

LISTAS DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Influência de diferentes meios de maturação sob os estágios de divisão nuclear por tratamento após maturação <i>in vitro</i>	39
Tabela 2. Influência de diferentes meios de maturação sob a clivagem de oócitos por tratamento após maturação <i>in vitro</i>	39

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS.....	10
2.1 Geral.....	10
2.2 Específicos.....	10
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
3.1 OOGÊNESE.....	11
3.2 FOLICULOGÊNESE.....	12
3.3 OBTENÇÃO DE OÓCITOS CAPRINOS.....	13
4. MATURAÇÃO OOCITÁRIA.....	15
4.1 MATURAÇÃO NUCLEAR.....	15
4.2 MATURAÇÃO CITOPLASMÁTICA.....	16
4.3 MEIOS E SUPLEMENTOS USADOS PARA MIV.....	17
5 FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i>	21
REFERÊNCIAS.....	23
6. ARTIGO CIENTÍFICO.....	33
EFEITO DE DIFERENTES MEIOS SOB A MATURAÇÃO E CLIVAGEM DE OÓCITOS CAPRINOS	
Resumo.....	33
Abstract.....	34
INTRODUÇÃO.....	35
MATERIAL E MÉTODOS.....	36
RESULTADOS.....	39
DISCUSSÃO.....	40
CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

A criação de caprinos tem se tornado bastante significativa favorecendo um ramo agropecuário da economia brasileira. O Brasil tem cerca de 9,3 milhões de caprinos (BEZERRA, 2009), sendo inicialmente a atividade focada na produção leiteira, porém no contexto atual percebe-se um crescimento no cenário de produção para carne e leite, incrementando dessa forma o cenário econômico e social do país (CORREA *et al.*, 2013). A maior criação se concentra na região Nordeste, com mais do 90% do efetivo nacional (CHAPAVAL *et al.*, 2011).

Bioteχνologias como a inseminação artificial (IA), transferência de embrião (TE) e produção *in vitro* de embriões (PIVE) têm favorecido o melhoramento genético dos rebanhos caprinos (BALDASSARRE; KARATZAS, 2004). A inserção dessas e outras biotécnicas na reprodução animal permite melhorias zootécnicas, por constituir-se em um dos fatores de maior importância nos sistemas produtivos (NEVES *et al.*, 2010). Logo, pequenos ruminantes se enquadram como um excelente modelo para o aperfeiçoamento e desenvolvimento destas tecnologias. A exemplo disto, um ovino foi o primeiro animal clonado por transferência nuclear de célula somática entre as espécies domésticas (FREITAS *et al.*, 2007). No entanto, o melhoramento genético e a intensificação do manejo reprodutivo são cruciais para o crescimento da atividade, tornando dessa forma os programas de reprodução assistida, indispensáveis para o sucesso da produção (BICUDO *et al.*, 2003).

Nesse sentido, a PIVE é considerada uma ferramenta eficaz para a produção de animais de maior mérito genético, sendo uma ferramenta relevante para exploração, à medida que maximiza o potencial reprodutivo dos rebanhos, bem como diminui o intervalo entre as gerações acelerando o melhoramento genético animal (VARAGO *et al.*, 2008). A PIVE compreende a colheita dos oócitos a partir de folículos antrais, a maturação, fecundação e o desenvolvimento dos embriões resultantes (FREITAS; MELO, 2010). O sucesso desta bioferramenta reprodutiva depende da eficiência de todas as etapas envolvidas do processo. No Brasil, esta biotecnologia ainda é iniciante em caprinos, contudo uma técnica atraente, e poderá ser uma parcela futura das atividades em tecnologia de embriões em caprinos, a exemplo do que ocorre em bovinos (FONSECA *et al.*, 2010).

Dentre as principais limitações encontradas na PIVE de caprinos está a falta de protocolos específicos para a espécie, principalmente no que diz respeito à etapa de maturação oocitária, que se apresenta como principal entrave de todo processo (PAULA *et al.*, 2008; FREITAS; MELO, 2010; LIMA, 2010; PARAMIO; IZQUIERDO, 2014).

A maturação oocitária é crucial para o sucesso da PIVE, interferências nesta etapa modificam o desenvolvimento, sobrevivência e implantação do embrião (RIZOS *et al.*, 2002; GILCHRIST *et al.*, 2004; MCNATTY *et al.*, 2004; GILCHRIST *et al.*, 2011). Somente após a bem-sucedida maturação *in vitro* é que o oócito trona-se competente para a sua fertilização e, por tanto, o normal desenvolvimento embrionário (VARAGO *et al.*, 2008). Estudos em oócitos de caprinos evidenciaram que sua maturação *in vitro* é diferente da *in vivo*, e destaca-se por oferecer grandes dificuldades nas técnicas de reprodução assistida que as envolvem, principalmente pela falta de adequados meios de maturação específicos à espécie (PAULA, 2008; FREITAS; MELO, 2010; PARAMIO; IZQUIERDO, 2014). Por outro lado, avanços recentes no conhecimento a cerca não só referentes à maturação oocitária, mas também das demais etapas da PIVE em pequenos ruminantes, tem levado a progressos satisfatórios no incremento em número de embriões produzidos com baixo custo, tanto para pesquisa, estudos biotecnológicos e de conservação de espécies (PARAMIO, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar o efeito de diferentes meios sob a maturação e consequente taxa clivagem de oócitos caprinos obtidos de matadouros.

2.2 Específicos

- Verificar a influência do FSH e do LH sobre a maturação e consequente clivagem de oócitos caprinos;
- Analisar o efeito do EGF no meio TCM 199 sobre a maturação e consequente clivagem de oócitos caprinos e;
- Verificar a influência da cisteína acrescida ao meio de maturação.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 OOGÊNESE

O processo pelo qual as células germinativas passam até atingir o estágio de oócito maduro é chamado de oogênese, após este processo a célula encontra-se pronta para a fecundação (RAVEN, 2013). Durante a fase de desenvolvimento fetal as células germinativas primordiais migram do epitélio do saco vitelínico para as cristas genitais e daí fazem a colonização das gônadas, em processo de formação. Eventos importantes na morfogênese do ovário fetal inclui a colonização por células germinativas primordiais, a interação destas com células somáticas e finalmente o estabelecimento da população definitiva de folículos primordiais (SAWYER *et al.*, 2002).

Ao chegarem às gônadas, as células germinativas passam por um processo de proliferação celular e formam os cordões sexuais, estes são formados na gônada indiferenciada (GUERQUIN *et al.*, 2010). Na gônada feminina, as células germinativas proliferam as células da região cortical, enquanto no macho, as da região medular (KOOPMAN, 2001). Essas oogônias passam pela divisão meiótica e chegam ao estágio de prófase I (PI) da meiose I (MI) e passam a ser chamados de oócitos primários (LUCCI *et al.*, 2001).

Dentre as mudanças que ocorrem durante a fase de desenvolvimento do oócito podem ser citadas as formações das junções gap ocorrendo entre o oócito e suas células somáticas circundantes; o desenvolvimento e deslocamento do complexo de Golgi para a periferia do oócito; o desenvolvimento do retículo endoplasmático liso e das gotas lipídicas; a formação dos grânulos corticais e zona pelúcida; a diferenciação da mitocôndria; a quebra dos centríolos; o acúmulo a transcrição do RNA mensageiro materno que será utilizado para sintetizar proteínas do oócito no desenvolvimento embrionário inicial (FAIR *et al.* 1996; HYTTEL *et al.*, 1997).

Em decorrência da onda pré-ovulatória do hormônio luteinizante (LH), os oócitos sofrem o processo de maturação (MAYES; SIRARD, 2001). Aqueles que foram atingidos pelo pico de LH, rompem a vesícula germinativa e progridem na meiose, passando pelos estágios de metáfase I (Met), anáfase I (AI) e telófase I (TI) completando o primeiro ciclo meiótico com a expulsão do primeiro corpúsculo polar e,

consequentemente, atingem a metáfase II (MII). Após chegar nesse estágio, o oócito detém seu desenvolvimento até que ocorra a fecundação (VAN DER HURK; ZHAO, 2005).

3.2 FOLICULOGÊNESE

A foliculogênese é um processo contínuo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando com o desenvolvimento do folículo primordial até atingir o estágio folicular pré-ovulatório (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). O folículo é a unidade fundamental do ovário, é composto por um oócito e por outros dois tipos celulares: *i*) células da teça e *ii*) células da granulosa, ambas têm sua morfologia modificada em virtude do crescimento do oócito durante a foliculogênese (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006).

Os folículos são classificados em dois grupos: *i*) pré antrais, fazendo parte desse os primordiais, primários e secundários e, *ii*) os antrais, os quais estão constituídos por os terciários e o pré-ovulatório. Os folículos primordiais são predominantes no ovário e encontram-se quiescentes (FORTUNE *et al.*, 2003). Esses folículos são formados por um oócito imaturo, rodeado por uma camada simples de células da pré-granulosa de formato pavimentoso (HUTT *et al.*, 2006). Essa classe de folículos permanece quiescente até que ocorra a ativação para converter-se em folículos em crescimento, já saem primários, secundários e terciários (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005; PEPE *et al.*, 2006).

Sendo que o primeiro indicio de ativação dos folículos primordiais é a retomada da proliferação das células da granulosa o que pode acontecer dias, meses ou anos após a sua formação (HIRSHFIELD, 1991).

A partir do momento que ocorre a ativação, os folículos entram em um curso pré-programado de desenvolvimento e maturação que são necessários para o sucesso da ovulação e fertilização, ou alternativamente são perdidos por atresia (FAIR, 2003). A formação dos folículos primários dar-se por um oócito circundado por células da granulosa de formato cuboide dispostas em uma única camada, nesse momento por meio de endocitose o oócito mantém contato com essas células (LUCCI *et al.*, 2001). Com a multiplicação das células da granulosa ocorre a formação de uma nova camada

de células dando origem ao grupo de folículos chamados secundários. Sendo que estes folículos são constituídos por um oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cuboide.

Com o desenvolvimento dos folículos, ocorre o espessamento da zona pelúcida tornando-se visível (LUCCI *et al.*, 2001), a formação das células tecais a partir do estroma intersticial (HONDA *et al.*, 2007). Nesta etapa, alguns componentes acelulares depositados em torno dos *microvilos* que podem ser vistos passando os limites da zona pelúcida e projetando-se no oócito (LUZ, 2008). Com o crescimento dos folículos secundários e a organização das células da granulosa em várias camadas, ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido denominado antro.

A partir deste estágio, os folículos passam a ser denominados terciários. Durante o desenvolvimento folicular, a produção de fluido antral é intensificada pelo aumento da vascularização folicular e permeabilidade dos vasos sanguíneos, os quais estão fortemente relacionados com o aumento do tamanho folicular. Durante o crescimento folicular antral, as células tecais secretam andrógenos aromatizáveis que se acumulam no fluido folicular (HICKEY *et al.*, 2005). Os andrógenos se difundem através da membrana basal do folículo e nas células da granulosa, onde atuam potencializando a ação do FSH no aumento da atividade das enzimas esteroidogênicas, e como substrato imediato para a conversão de estrógenos por tais enzimas (TANIGUCHI *et al.*, 2007).

O desenvolvimento dos folículos antrais é caracterizado pelo crescimento, seguindo o recrutamento, a seleção e a dominância (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Entretanto, o desenvolvimento de folículos antrais e pré-ovulatório, é o pré-requisito para a formação de ovulação e corpo lúteo, assim como para a manutenção da fertilidade (DRUMMOND, 2006).

3.3 OBTENÇÃO DE OÓCITOS CAPRINOS

A fertilização *in vitro* (FIV) utiliza oócitos, cuja coleta perfaz diferentes modos. Eles podem ser obtidos a partir de folículos maduros em fase pré-ovulatória ou de diferentes estágios, tanto de animais vivos ou mortos (WANI, 2002) mediante aspiração

oocitária ou pelo fatiamento de ovários que, geralmente, provem de abatedouro (COGNIÉ e BARIL, 2002).

Segundo Baldassarre *et al.* (2002) e Graff *et al.* (1999), a forma mais eficiente de obtenção de oócitos, a partir de fêmeas vivas, é por aspiração ovariana transvaginal por laparoscopia ou guiada por ultrassonografia. Em pequenos ruminantes, Denadai *et al.* (2017) mencionam que a aspiração folicular via laparoscópica é uma técnica eficiente para a obtenção de oócitos, em concordância com os achados por Baldassarre *et al.* (1994). Os autores apontam que a recuperação de oócitos *in vivo*, utilizando esta técnica simples e de baixo custo, pode gerar avanços interessantes nas tecnologias aplicadas em esquemas de seleção.

Na colheita, dado procedimento considera a aspiração folicular dos ovários por acesso cirúrgico da cavidade abdominal em fêmeas adultas e pré-púberes (BASSO *et al.*, 2008; CORDEIRO, 2006). Esta técnica é considerada pouco traumática, se apresentando como excelente alternativa para exploração do potencial reprodutivo de cabras, principalmente quando associada à estimulação ovariana exógena (BALDASSARRE; KARATZAS, 2004).

A recuperação de oócitos na modalidade transvaginal guiada por ultrassom em fêmeas vivas representa uma biotécnica pouco utilizada em pequenos ruminantes em razão da dificuldade de execução em animais de pequeno porte (BALDASSARRE *et al.*, 1994). Por meio desse método, a fêmea é previamente anestesiada pela via epidural na região sacrococcígea, com posterior inserção de transdutor acoplado a agulha com sistema de vácuo pela vagina da doadora. Nesta etapa da técnica, o profissional localiza os ovários e os posiciona com os dedos da mão esquerda inseridos no reto do animal, para a aspiração de oócitos (GRAFF *et al.*, 1999).

O tratamento hormonal é fundamental nos métodos de aspiração realizados em animais vivos, com vistas a melhorar a taxa de colheita dos oócitos. Segundo estudos anteriores, o protocolo de sincronização e estimulação ovariana mais utilizado em pequenos ruminantes é a implantação de esponjas saturadas de progestágenos, com aplicações de FSH e/ou eCG em doses múltiplas (FREITAS; MELO, 2010) ou dose única (BERNARDI, 2005). Vários estudos apontam que o momento indicado para

aspiração folicular em caprinos ocorre cerca 36 horas após a injeção da gonadotrofina (FREITAS; MELO, 2010; PADILHA, 2012).

Em concordância com Bernardi (2005) e, Freitas e Melo (2010), a utilização de oócitos oriundos de ovários de abatedouro restringe-se a ensaios experimentais diante das dúvidas acerca do estado sanitário, nutricional e principalmente genético da doadora. Nesses casos, os ovários devem ser transportados até o laboratório em meio PBS ou em solução de NaCl (0,9%) com antibióticos, sendo aspirados por agulhas acopladas a seringas, ou através do fatiamento em placa de petri. Em razão do desconhecimento acerca do ambiente as que as doadoras foram expostas antes de serem abatidas, os oócitos coletados através de tal técnica têm menos probabilidade de desenvolvimento após a fertilização *in vitro*. Tal situação justifica-se uma vez eles provem de folículos menores, situação pouco indicada para proceder à aspiração (COGNIÉ; BARIL, 2002).

4. MATURAÇÃO OOCITÁRIA

Durante a PIVE é necessário que aconteça maturação oocitária completa, por tanto, obter um oócito competente e apto a ser fecundado (BLANCO *et al.*, 2011). O processo de maturação é decorrente de várias mudanças, de forma sincrônica e ordenada no núcleo, como a progressão de prófase I (PI) à metáfase II (MII), e no citoplasma, através de mudanças nas organelas, dentre as quais as mais estudadas são as que ocorrem nos grânulos corticais e nas mitocôndrias (GORDON, 2003). Esta gama de transformações nucleares e citoplasmáticas no oócito fazem-se necessárias para serem fecundados e, conseqüentemente, atinjam à fase de blastocisto (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005; SÁNCHEZ; SMITZ, 2012).

4.1 MATURAÇÃO NUCLEAR

A maturação nuclear está relacionada com a capacidade do oócito em retomar a meiose até o estágio de metáfase II (WATSON, 2007; BLANCO *et al.*, 2011). Esse processo, quando estudado *in vitro* (MIV), dura aproximadamente 26 horas com oócitos caprinos após serem colhidos do ambiente folicular, promovendo luteinização das células da granulosa e o reinício do processo meiótico do oócito (LANUZA *et al.*,

1994). Isso acontece em decorrência da perda de sinalização entre o oócito e as células da granulosa feita pelas junções *gap* (SOUZA *et al.*, 1998).

A partir do momento que essa sinalização cessa, há condensação da cromatina e quebra da vesícula germinativa permitindo que a maturação nuclear que se encontrava na prófase I continue até metáfase II (SOUZA *et al.* 1998). Nesta última fase, ocorre rompimento do envelope nuclear do oócito, há condensação e consequente formação do fuso meiótico, com posterior segregação dos cromossomos e liberação de uma célula pequena, conhecida como primeiro corpúsculo polar (VORONINA; WESSEL, 2003; HUMBLOT *et al.*, 2005; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005; TOSTI, 2006; QUETGLAS, 2007; FERREIRA *et al.*, 2008). Dessa forma, cromossomos homólogos são divididos e passam a formar dois grupos, cada um deles com a metade do número original de cromossomos característico de cada espécie (CAN *et al.*, 2003). Como resultado de tal divisão a segunda célula resultante, de maior porte em comparação do corpúsculo polar, é conhecida como oócito secundário.

Contudo, a quebra da vesícula germinativa do oócito permite diacinese, metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI), completando a primeira divisão meiótica e passando para a MII da segunda divisão meiótica, quando ocorre o segundo bloqueio meiótico (TOSTI, 2006; QUETGLAS, 2007). Em consequência deste processo meiótico, o oócito encontra-se quiescente na MII até sua fecundação (MAYES; SIRARD, 2001).

4.2 MATURAÇÃO CITOPLASMÁTICA

Segundo Lee *et al.* (2016), na maioria dos estudos apenas a maturação nuclear foi considerada para a avaliação do sucesso da maturação oocitária *in vitro*, enquanto a maturação citoplasmática não recebeu atenção semelhante. Ela ocorre a partir do momento em que o oócito torna-se competente para retomar a meiose (SÁNCHEZ; SMITZ, 2012), e compreende grandes mudanças no citoplasma como o acúmulo de grânulos corticais (DUCIBELLA *et al.*, 1990), a migração das mitocôndrias à posição perinuclear (KATAYAMA *et al.*, 2006) e a redistribuição de organelas (KAN *et al.*, 2011). Estudos anteriores têm evidenciado que todas estas modificações citoplasmáticas, além de indicar maturação do oócito, exercem influência nele na

diminuição da polispermia (HYTTEL *et al.*, 1997; BLANCO *et al.*, 2011, VAN DEN HURK; ZHAO, 2012).

Os grânulos corticais são vesículas secretoras de ooplasma que em decorrência da penetração do espermatozoide no oócito, não é mais produzido (BURY; COELHO; GLOVER, 2016). De acordo com Wessel *et al.* (2001), sua composição baseia-se em proteases, glicosidases, enzimas e proteínas estruturais que modificam a zona pelúcida atuando como barreira física e bioquímica no bloqueio da polispermia. Poucos estudos foram desenvolvidos visando estudar a migração mitocondrial, sendo que seu significado, ainda não está totalmente claro (INGRAHAM, 2003). Crocomo *et al.* (2013) estudaram o efeito de meios de maturação, com e sem inibidores, sobre esta característica e concluíram que a os oócitos estudados mostraram sinais de maturação sem mudanças na sua ultraestrutura nem degeneração, onde foi observada uma migração mitocondrial normal.

Já a redistribuição das organelas, de acordo com Ferreira *et al.* (2009), é estabelecido por várias mudanças ultra estruturais em relação à morfologia a maturação dos ovócitos e, dentro destes, é a mitocôndria a organela relevante na aquisição de competência no desenvolvimento oocitária. Em um estudo anterior, Albertini (1992) informou que o arranjo espacial das organelas é consequência da modificação da organização do citoesqueleto do oócito, o qual forma a estrutura citoplasmática onde as organelas limitadas por membrana se translocam, assumindo posições definidas durante o crescimento do oócito. Contudo, tem sido evidenciado que o desenvolvimento bem sucedido de oócitos fertilizados, para o estágio de blastocisto, depende tanto da competência funcional do fuso meiótico assim como de outros elementos do citoesqueleto, para garantir um número normal de cromossomos no zigoto ou capacidade do citoplasma de oócito para garantir o início da fertilização (EGERSZEGI *et al.*, 2013).

4.3 MEIOS E SUPLEMENTOS USADOS PARA MIV

A PIVE requer da interação de vários fatores para conseguir alcançar bons resultados. Por tanto, as condições às que os gametas, tanto masculino e/ou feminino, são submetidos devem ser similares às fisiológicas *in vivo* (KHURAMA; NIEMANN, 2000; HANSEN *et al.*, 2010). Deste modo, tornam-se necessários estudos a cerca dessas

condições para serem mimetizadas *in vitro* (SANGILD *et al.*, 2000; BESENFELDER *et al.*, 2012).

Os sistemas de cultivo (SC) utilizados na PIVE tem sido estudado e vêm sendo objeto de estudos frequentes (RIZOS *et al.*, 2003; FEUGANG *et al.*, 2009; FELMER *et al.*, 2011). Estudos anteriores determinam que eles podem ser classificados como sistema de cultivo *i*) definido (SCD); *ii*) semi-definido (SCSD) e *iii*) indefinido (SCI) (CAMARGO *et al.*, 2006). O SCD é aquele isento de soro, de células sanguíneas ou de outros constituintes celulares. Já, o SCI leva na sua composição soro, que é um componente biológico complexo, constituído por fatores de crescimento, hormônios e proteínas. Finalmente, SCSD é intermediário entre os dois anteriores (GORDON, 1994; FEUGANG *et al.*, 2009) e apresenta a peculiaridade de substituir o soro por albumina, fato tal como intuito eliminar vários componentes potencialmente nocivos do soro (BAVISTER, 1995). Contudo, os SC podem ser enriquecidos através da adição de macromoléculas de origem animal como a albumina sérica bovina (BSA) e o soro fetal bovino (PBS), ou de origem sintética como o álcool polivinil (PVA), o álcool pirrolidona (PVP), o polissacarídeo Ficoll e, o meio comercial Knockout (MINGOTI *et al.*, 2011).

Durante a produção *in vitro* diferentes protocolos já foram usados como testes para a maturação de oócitos buscando os melhores resultados (HANSEN *et al.*, 2010; FELMER *et al.*, 2011). Dentre as substâncias acrescidas aos meios de maturação destacam-se o fluido sintético de oviduto (SOF) (Gandhi *et al.*, 2000) e o meio de cultivo tecidual 199 (TCM 199). O TCM 199, proposto por Moor *et al.* (1984), é a substância mais difundida entre os laboratórios de produção *in vitro*, sendo, geralmente utilizado com PBS, FSH, LH, piruvato, glutamina e antibiótico e outras. Por sua parte os hormônios FSH, FSH e estradiol são adicionados aos meios de cultivo visando melhorar a eficiência da maturação nuclear e citoplasmática. Fato que é justificado pela importância destes processos na continuidade da PIVE (COGNIÉ *et al.*, 2003).

Já a L-glutamina e o piruvato usados como fonte de energia para o ócito. A cisteamina, 2- mercaptoetanol, cisteína, cistína e glutatona (GSH), são substâncias tem sido adicionado ao meio de maturação buscando proteger ao oócito contra os efeitos

originados a partir de radicais livres, os mesmos que estão presentes na atmosfera da estufa de maturação (MATOS *et al.*, 2002).

Por sua vez o fator de crescimento epidérmico (EGF) é largamente utilizado em meios de maturação cujo efeito aparece na estimulação da maturação nuclear e citoplasmática em várias espécies mamíferas (WANI *et al.*, 2012). Além disso, este fator de crescimento tem como função principal a de estimular a síntese de glutatona intracelular no oócito (DE MATOS *et al.*, 2002). Musallam *et al.* (2004) demonstraram claramente que o EGF induz especificamente o esgotamento de glutatona intracelular, o que é importante para a atividade anti-apoptótica completa do EGF. Os autores adicionam que dada depleção tem associação a diminuição da atividade proteolítica da caspase-3, a qual é necessária para determinadas alterações bioquímicas e morfológicas durante a apoptose.

Contudo, a glutatona é responsável pela proteção do DNA, ela age na síntese de proteínas e no transporte de aminoácidos regulando a maturação oocitária mediante o estímulo da quebra da vesícula germinativa e da expansão das células do cumulus oophorus (Buccione *et al.*, 1990). Está intimamente envolvida na regulação de vários processos importantes da fisiologia ovariana (SILVA *et al.*, 2006) dentre eles, a proliferação celular, diferenciação e esteroidogênese (SAHA *et al.*, 2000). Além de possuir funções antioxidantes na maturação oocitária, a glutatona promove a formação do pró-núcleo masculino durante a fecundação (WHITAKER; KNIGHT, 2004). De acordo com Toyoda *et al.* (2007), esta substância antioxidante é considerada como fator mitogênico, o qual estimula a proliferação de diversos tipos celulares.

No folículo ovariano, a glutatona é responsável pela estimulação da mitose das células foliculares, ou seja, das células de granulosa/teca, promove o crescimento do oócito, mantém a viabilidade folicular, favorece a produção de esteroides, induz a expansão das células do cumulus e, ainda, exerce papel fundamental e determinante na maturação nuclear e citoplasmática do oócito. (SILVA *et al.*, 2010). Segundo Lonergan *et al.* (1996) a suplementação do meio de MIV com EGF, em diferentes concentrações (1, 10 e 100 ng/mL), foi responsável pela estimulação da expansão das células do cumulus, aumentou a porcentagem de oócitos que atingiram o estágio de MII, e também a proporção de embriões bovinos que chegaram ao estágio de blastocisto. O EGF é

também conhecido como um fator de sobrevivência *in vivo* e *in vitro* (MARKSTRÖM *et al.*, 2002).

A degradação da cisteína resulta na cisteamina, que exerce função no sistema biológico clivando ligações dissulfeto. Nesse sentido, a sua estreita relação com a síntese de glutathione durante a produção *in vitro* de embriões vem sendo pesquisada amplamente (DE MATOS *et al.*, 2002).

A síntese de glutathione é dependente da disponibilidade de cisteína presente nos meios de cultura (LUDERER *et al.*, 2001). Todavia, a molécula de cisteína, quando em ambiente extracelular, é instável sendo auto-oxidada à cistina. O potencial da cisteamina em quebrar ligações dissulfeto reduz a cistina à cisteína, proporcionando, assim, maior disponibilidade de cisteína no meio de produção *in vitro* de embriões e, conseqüentemente, o aumento na síntese de glutathione, o qual melhora a taxa de desenvolvimento dos blastocistos (DE MATOS; FURNUS, 2000).

Córdova (2010) e Merton *et al.* (2013) avaliaram *in vitro* o efeito da suplementação com cisteamina durante a MIV e a CIV de oócitos colhidos em abatedouro. Os resultados demonstram que houve acréscimo referente às taxas de embriões produzidos, assim como aumento da concentração de glutathione durante a MIV, o que sugere melhora na competência oocitária, isto como consequência do incremento na síntese de glutathione no oócito (DE MATOS *et al.*, 1996; DE MATOS; FURNUS, 2000).

Do efeito similar ao da glutathione, o ácido ascórbico, ou Vitamina C, é uma substância hidrossolúvel com ação antioxidante cuja presença é responsável pela redução do α -tocoferol, os peróxidos e as espécies reativas de oxigênio (ROS) (RUCKER *et al.*, 2008). Da mesma forma, age na prevenção da formação de hidroperóxido de lipídios nas lipoproteínas plasmáticas e de membrana, concomitante à glutathione, protegendo a célula dos danos oxidativos (NORDBERG; ARNÉR, 2001). Este ácido tem sido associado à manutenção da viabilidade celular no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais (SILVA *et al.*, 2010).

Já no ovário, a vitamina C atua como cofator da síntese de colágeno, amidação peptídica e facilitador do crescimento folicular (MURRAY *et al.*, 2001). Sua adição no meio de cultura previne a apoptose em células foliculares (TILLY *et al.*, 1995; EPPIG *et al.*, 2000). É encontrado em todos os tecidos animais e está presente em especial nas glândulas hipofisárias e adrenais, e nas gônadas (LUCK *et al.*, 1995).

No ovário, encontram-se nas células da granulosa, células da teca interna, células luteínicas e no oócito (THOMAS *et al.*, 2001). Sua propriedade antioxidante está relacionada à sua capacidade de reduzir danos causados pelos ROS devido à síntese de ascorbato, um radical livre estável (BUETTNER, 1993). Este mecanismo desempenha inúmeras funções de proteção à célula que incluem a prevenção de mutações no DNA (LUTSENKO *et al.*, 2002), a proteção contra a peroxidação lipídica (BARJA *et al.*, 1994; KIMURA *et al.*, 1992) e a reparação de aminoácidos oxidados para manutenção da integridade de proteínas (BARJA *et al.*, 1994; CADENAS *et al.*, 1998), a produção de hormônios esteróides (TSUJI *et al.*, 1989) e inibição da apoptose em células da granulosa em bovinos (TILLY; TILLY, 1995) e em complexos cumulus-oócito de camundongas (EPPIG *et al.*, 2000; MURRAY *et al.*, 2001).

5 FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*

Caracterizado como um processo criterioso devido às complexidades da maturação *in vitro* dos oócitos submetidos ao desenvolvimento (GEARHART; COUTIFARIS, 2011), a fertilização *in vitro* (FIV) depende de fatores como a maturação adequada dos oócitos, a seleção e capacitação de espermatozoides viáveis a partir de sêmen fresco ou crio preservado (PARAMIO, 2010), tanto como de um meio de cultivo adequado para todas suas etapas (PARAMIO; IZQUIERDO, 2014). Antes da fecundação é necessária a diferenciação e separação dos espermatozóides vivos dos mortos, do plasma seminal e/ou diluente utilizado para crio preservação. Desse modo usa-se a biotécnica seminal *swim-up* e gradiente de concentração de Percoll (CAMARGO *et al.*, 2009).

Por sua vez o *swim-up* é o método que consiste na migração ascendente dos espermatozoides baseado na velocidade de progressão direcional destes eliminando o plasma seminal, debris e material amorfo, separando a amostra em frações móveis e não-móveis (AMY; QUAGLIARELLO, 1987). Essa técnica consiste em depositar o

sêmen no fundo de um tubo contendo 1 mL de meio, em que o sêmen permaneça no fundo do tubo coberto pelo meio. Em seguida, esse tubo é levado à ambiente à 39°C para permitir que os espermatozoides migrem a posição superior do tubo, deixando o restante no fundo (GONÇALVES *et al.*, 2008).

O gradiente de Percoll é feito com duas camadas de gradientes de densidade (90 e 45%) e causa a separação de espermatozoides viáveis do plasma seminal, debrís e material amorfo pós-centrifugação (LIU *et al.*, 2013). Brevemente, em um tubo é colocado inicialmente 250 µL de solução gradiente de Percoll a 90% e, posteriormente, 250 µL de da mesma a 45%. Logo, o sêmen é vertido sobre esse gradiente e o tubo segue para centrífuga a 9000G por 10 minutos. Nesse caso, o sobrenadante é desprezado para, posteriormente e com cuidado, retirar o pellet com espermatozoides viáveis para FIV e PIVE (FREITAS; MELO, 2010).

A capacitação espermática *in vitro*, é outro ponto de suma importância para se obter sucesso na FIV. Rotineiramente o protocolo mais utilizado é a indução, após descongelamento e centrifugação em gradiente de Percoll (COGNIÉ *et al.*, 2003). Outros autores utilizaram heparina como capacitor em sêmen de caprino e obtiveram melhores taxas de clivagem, reflexo do sucesso da fecundação (KATSKA-KSIAZYKIEWICZ *et al.*, 2004).

Após a separação de espermatozoides viáveis para fecundação, os oócitos maturados são lavados e colocados em placas com gotas de meio FIV acrescido com soro de cabra em cio, em seguida adicionam-se os espermatozoides capacitados para, seguidamente, a placa segue para a estufa a 38°C em atmosfera com concentração de CO₂ controlado (FREITAS; MELO, 2010). A concentração de espermatozoides usada nesta técnica tem variado de 1 a 3,5 x 10⁶ espermatozoides/mL (BALDASSARRE; KARATZAS, 2004; RODRIGUEZ-GONZALEZ *et al.*, 2003). Segundo Cognié *et al.*(2003) o período de incubação dos oócitos com os espermatozoides em temperatura de 38°C durante 17 horas, foi estabelecido por questões práticas já que após quatro horas de incubação, tanto a taxa de clivagem como a de blastocistos demonstraram valores similares aos das 17 horas.

REFERÊNCIAS

- ABE, H.; HOSHI, H. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. **Journal of Reproduction and Development**, v.49, n.3, p.193-202, 2003.
- ALBERTINI, D. F. Cytoplasmic microtubular dynamics and chromatin organization during mammalian oogenesis and oocyte maturation. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 296, n. 1–2, p. 57–68, 1992.
- ALVES, D. F.; RAUBER, L. P.; RUBIN, F. B.; BERNARDI, M. L.; DEZEN, D.; SILVA, C. A. M.; RUBIN, M. I. B. Desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular ou TCM-hepes. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 279-286, 2003.
- AMY, M.; QUAGLIARELLO, J. Semen quality before and after processing by a swim-up method: relationship to outcome of intrauterine insemination. **Fertility and sterility**, v. 48, n. 4, p. 643–648, 1987.
- ANDRADE E.R.; STERZA M. F. A; SENEDA. M .M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v. 34, n. 2, p. 79 -85, 2010.
- BALDASSARRE H., KARATZAS C.N. 2004. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. **Anim Reprod Sci** 82/83:255-266.
- BALDASSARRE, H. *et al.* Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. **Animal Reproduction Science**, v. 35, n. 1, p. 145–150, 1994.
- BAVISTER, B. D. Culture of preimplantation embryos: Facts and artifacts. **Human Reproduction Update**, v.1, n.2, p.91-148, 1995.
- BLANCO, M. R., DEMYDA, S., MORENO MILLÁN, M., GENERO, E.; Developmental competence of *in vivo* and *in vitro* matured oocytes:A review. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v.6, n.7, p.155-165, 2011.

BOLS, P. E. J.; JORSSSEN, E. P. A.; GOOVAERTS, I. G. F.; LANGBEEN, A.; LEROY, J. L. M. R. High throughput non-invasive oocyte quality assessment: the search continues. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 420-425, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasil. Assessoria de Gestão Estratégica (Org.). Projeções do Agronegócio, Brasil 2012/13 a 2022/23. Brasília, 2013. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/arq>>.

BREITHAUPT, D.E. Modern application of xanthophylls in animal feeding - a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 501-506, 2007.

BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T.K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v. 66, p. 5-13, 2006.

BUCCIONE R, SCHROEDER A, EPPIG J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biol Reprod**, v.43, p.543-547, 1990.

BURY, L.; COELHO, P. A.; GLOVER, D. M. From Meiosis to Mitosis. In: **Current Topics in Developmental Biology**. Elsevier, 2016. v. 120p. 125–171.

CAMARGO, L. S. A. *et al.* Factors influencing *in vitro* embryo production. **Animal reproduction**, v. 3, n. 1, p. 19–28, 2006.

CAMARGO, L. S. A.; FONSECA, J. F.; VIANA, J. H. M.; SÁ, W. F. Produção *in vitro* de embriões caprinos: estado da arte. In: FONSECA, J. F. *et al.* **Produção de caprinos na região da Mata Atlântica**. 1ª Edição. Juiz de Fora: Embrapa, 2009. p. 107-122.

CAN, A. SEMIZ, O.; CINAR, O. Centrosome and microtubule dynamics during early stages of meiosis in Mouse oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v.9, p. 749-756, 2003.

CARNEIRO GF, NAKAZAWA M, CASTRO SBM, GOMES YM. Efeito do IGF-I na maturação *in vitro* de oócitos caprinos. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 17, 2003, Beberibe, CE. **Anais... Beberibe**, CE: SBTE, 2003. p.286.

CELESTINO J.J., BRUNO J.B., SARAIVA M.V., ROCHA R.M., BRITO I.R., DUARTE A.B., ARAÚJO V.R., SILVA C.M., MATOS M.H.T, CAMPELLO C.C., SILVA J.R., FIGUEIREDO J.R. Steady-state level of epidermal growth factor (EGF)

mRNA and effect of EGF on *in vitro* culture of caprine preantral follicles. **Cell Tissue Res.** v.344, p. 539-50, 2011.

CHAN, K.C.; MONG, M.C.; YIN, M.C. Antioxidative and anti-inflammatory neuroprotective effects of astaxanthin and canthaxanthin in nerve growth factor differentiated PC12 cells. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 7, p. 225-231, 2009.

CHAPAVAL, L.; ALVES, F.; NEVES, A. Boas práticas. In: **Produção de caprinos e ovinos no Semiárido**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2011. p. 489–512.

COGNIÉ, Y.; BARIL, N. P.; MERMILLOD, P. Current status of embryo Technologies in sheep and goat. **Theriogenology**, França, v. 59, p. 171-188, 2003.

COGNIÉ, Y.; POULIN, N.; LOCATELLI, Y.; MERMILLOD, P. State-of- the-art production, conservation and transfer of *in-vitro*- produced embryos in small ruminants. **Reproduction Fertil Dev**, v. 16, p. 437- 445, 2004.

CONAB –Companhia Nacional de Abastecimento. Indicadores da Agropecuária: Quadr de Suprimentos. Disponível em <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1538&t=2>>. Acessado em 19/05/2016.

CÓRDOVA, B. Effect of the addition of insulin-transferrin-selenium and/or L-ascorbic acid to the *in vitro* maturation of prepubertal bovine 57 oocytes on cytoplasmic maturation and embryo development. **Theriogenology**, v. 74, n. 8, p.1341-1348, 2010

CORREA, B. R. *et al.* Sistemas produtivos de caprinocultura leiteira no semiárido paraibano: caracterização, principais limitantes e avaliação de estratégias de intervenção. **Pesquisa veterinária brasileira**, v. 33, n. 3, p. 345–352, 2013.

CROCOMO, L. F. *et al.* Effect of roscovitine and cycloheximide on ultrastructure of sheep oocytes. **Small Ruminant Research**, v. 109, n. 2–3, p. 156–162, jan. 2013.

DE MATOS, D. G. *et al.* Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. **Theriogenology**, v. 57, n. 5, p. 1443–1451, 15 mar. 2002.

DE MATOS, D. G. *et al.* Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, n. 4, p. 451–457, 1996.

DE MATOS, D. G.; FURNUS, C. C. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development: effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology**, v. 53, n. 3, p. 761–771, 2000.

DE MATOS, D.G.; GASPARRINI, B; PASQUALINI, S.R. Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. **Theriogenology**, v. 57, n. 5, p. 1443-1451, 2002.

DENADAI, R. *et al.* Pattern of follicular development in sheep subjected to ovarian superstimulation after follicular ablation by laparoscopic ovum pick-up. **Ciência Rural**, v. 47, n. 1, 2017.

DRUMMOND, A. E. The role of steroids in follicular growth. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 4, n. 1, p. 16, 2006.

DUCIBELLA, T. *et al.* Precocious loss of cortical granules during mouse oocyte meiotic maturation and correlation with an egg-induced modification of the zona pellucida. **Developmental biology**, v. 137, n. 1, p. 46–55, 1990.

EGERSZEGI, I. *et al.* Comparison of cytoskeletal integrity, fertilization and developmental competence of oocytes vitrified before or after *in vitro* maturation in a porcine model. **Cryobiology**, v. 67, n. 3, p. 287–292, dez. 2013.

FERREIRA, E. M. *et al.* Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 836–848, mar. 2009.

FERREIRA, E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; MEIRELLES, F. V.; FERRIANI, R. A.; NAVARRO, P. A. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v.71, n.5, p.836-848, 2009.

FONSECA JF, SOUZA JMG, CAMARGO LSA. Estado da arte de ovócitos e embriões de caprinos e ovinos: passado, presente, futuro. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, p. 353-369, 2010.

FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.135-163, 2003.

FREITAS V.J.F., Serova I.A., Andriiva L.I., Serov O. 2007a. Estado da arte na produção de caprinos transgênicos clonados. **Acta Scientiae Veterinariae** 35:899-904.

FRY, R. C. No difference in embryo production from oocytes collected by ovum pick-up from commercial cows when using either hepes- or bicarbonate-buffered IVM media. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 304, 2000

GARCIA, J. M. Produção *in vitro* de embriões bovinos: diferentes procedimentos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 26, p. 280, 1998.

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

GEARHART, J.; COUTIFARIS, C. In Vitro Fertilization, the Nobel Prize, and Human Embryonic Stem Cells. **Cell Stem Cell**, v. 8, n. 1, p. 12–15, jan. 2011.

GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SIQUEIRA, L. C.; ANTONIAZZI, A. Q. Biotecnologias da reprodução animal Produção *in vitro* de embriões. **Ciências Veterinárias nos Trópicos**, v. 11, p. 135-138, 2008., v. 11, p. 135-138, 2008.

GONÇALVES, P.B.D.; BARRETA, M.H.; SANDRI, L.R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A.Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Produção Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.212- 17, abr./jun. 2007.

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

GORDON , I. Laboratory production of cattle embryos . **Maturing the bovine SSIMM**, S.; **Moocytes**. 2 ed. Cambridge University Press, 2003, cap. 4. 112-157.

GUERQUIN, M.-J. *et al.* New testicular mechanisms involved in the prevention of fetal meiotic initiation in mice. **Developmental Biology**, v. 346, n. 2, p. 320–330, out. 2010.

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

INGRAHAM, C. Developmental fate of mitochondria microinjected into murine zygotes. **Mitochondrion**, v. 3, n. 1, p. 39–46, ago. 2003.

KAN, R. *et al.* Regulation of mouse oocyte microtubule and organelle dynamics by PADI6 and the cytoplasmic lattices. **Developmental Biology**, v. 350, n. 2, p. 311–322, fev. 2011.

KATAYAMA, M. *et al.* Mitochondrial distribution and microtubule organization in fertilized and cloned porcine embryos: Implications for developmental potential. **Developmental Biology**, v. 299, n. 1, p. 206–220, nov. 2006.

KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; RYNSKA, B.; GAJDA, B.; SMORAG, Z. Effect of donor stimulation, frozen sêmen and heparina treatment on the efficiency of in vitro embryo production in goats. **Theriogenology**, v. 62, n. 3, p. 576-586, ago. 2004.

KOOPMAN, P. Gonad development: signals for sex. **Current Biology**, v. 11, n. 12, p. R481–R483, 2001.

LEE, S. *et al.* Lanosterol influences cytoplasmic maturation of pig oocytes in vitro and improves preimplantation development of cloned embryos. **Theriogenology**, v. 85, n. 4, p. 575–584, mar. 2016.

LEHMKUHL, R. C.; MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A. D.; PINTO, M. G. L.; FAVA, R. C.; SOARES, M. P.; THALER NETO, A.; SILVA, C. A. M.; RUBIN, M. I. B. Desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular e submetidos a FIV. **Arquivos da faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 28, p. 276, 2000

LIU, B.; CUI, Y.; YU, S. Effect of Swim-Up and Percoll Treatment on Sperm Quality and In vitro Embryo Development in Yak. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 12, n. 12, p. 2235–2242, dez. 2013.

LONERGAN, P., CAROLAN, C., VAN LANGENDONCKT, A., DONNAY, I., KHATIR, H., MERMILLOD, P., 1996. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. **Biology of reproduction** 54, 1420-1429.

LUCCI, C.M.; SILVA, R.V. CARVALHO, C.A.; FIGUEIREDO, R.; BÃO, N. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Ruminant Research**. v. 41, p. 61-69, 2001.

LUDERER, U. *et al.* Gonadotropin regulation of glutathione synthesis in the rat ovary☆. **Reproductive Toxicology**, v. 15, n. 5, p. 495–504, 2001.

LUZ, V. B. **Perfusão do dimetilsulfóxido em tecido ovariano caprino**. Teses e Dissertações—[s.l.] UECE/CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 2008.

MACHATY, Z.; PEIPPO, J., PETER, S. Production and manipulation of bovine embryo: techniques and terminology. **Theriogenology**, v. 78, p. 937- 950, 2012.

MAX, M. C.; SANTOS, G. M. G.; MELO-STERZA, F. A.; SILVA-SANTOS, K. C.; MOROTTI, F.; BASSO, A. C.; PONTES, J. H. F.; BALDASSARRE, H.; SENEDA, M. M. *In vitro* embryo production in sheep: Pregnancy after long periods of oocyte and

MAYES, M.; SIRARD, M.D. The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. **Theriogenology**, v.55,p.911-922, 2001.

MERTON, J. S.; KNIJN, H. M.; FLAPPER, H.; DOTINGA, F.; ROELEN, B. A. J.; VOS, P. L. A. M.; MULLAART, E. Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation of slaughterhouse-and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf characteristics. **Theriogenology**, v. 71, p.1–7, 2013.

MURRAY, A. A.; MOLINEK, M. D.; BAKER, S. J.; KOJIMA, F. N.; SMITH, M. F.; HILLIER, S. G.; SPEARS, N. Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles *in vitro*. **Reproduction**, v.121, p.89-96, 2001

MUSALLAM, L. *et al.* EGF mediates protection against Fas-induced apoptosis by depleting and oxidizing intracellular GSH stocks: EGF ANTI-APOPTOTIC EFFECT AND GSH DEPLETION. **Journal of Cellular Physiology**, v. 198, n. 1, p. 62–72, jan. 2004.

NEVES, J. P.; MIRANDA, K. L.; TORTORELLA, R. D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. 2010.

PARAMIO, M. T. In vivo and in vitro embryo production in goats. **Small Ruminant Research**, v. 89, n. 2–3, p. 144–148, abr. 2010.

PARAMIO, M. T.; IZQUIERD, D. Current Status of *In Vitro* Embryo Production in Sheep and Goats. **Reproduction in Domestic Animalis**, Barcelona, v. 49, p. 37–48, 2014.

PAULA, N. R. O.; CARDOSO, J. F. S.; OLIVEIRA, M. A. L.; FREITAS, V. J. F. Embriões caprinos produzidos *in vivo* ou *in vitro*: técnicas, problemas e perspectivas. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.1, p.21-35, jan./mar. 2008.

RAVEN, C. P. **Oogenesis: the storage of developmental information**. [s.l.] Elsevier, 2013.

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

ROSA, A.P.; SCHER, A.; SORBARA, J.O.B.; BOEMO, L.S.; FORGIARINI, J.; LONDERO, A. Effects of canthaxanthin on the productive and reproductive performance of broiler breeders. **Poultry Science**, v. 91, p. 660–666, 2012.

RUCKER, R. B.; MORRIS, J.; FASCETTI, A. J. Chapter 23 - Vitamins. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Eds.). . **Clinical Biochemistry of Domestic Animals (Sixth Edition)**. San Diego: Academic Press, 2008. p. 695–730.

SAHA, S., SHIMIZU, M., GESHI, M., IZAIKE, Y. *In vitro* culture of bovine preantral follicles. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 63, p. 27-39, 2000.

SÁNCHEZ, F., SMITZ, J.; Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, p.1896-1912, 2012.

SAWYER, H. R. *et al.* Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 4, p. 1134–1150, 2002.

SILVA, .G. M.; ARAÚJO, V. R.; DUARTE, A. B. G. ; LOPES, C. A. P; FIGUEIREDO, J. R. Papel dos antioxidantes no cultivo *in vitro* de células ovarianas. **Rev.Bras. Reprod. Anim.**; Belo Horizonte, v.35, n. 3, p. 315-326, julh./ set. 2011.

SILVA, C.M.G., CASTRO, S.V., FAUSTINO, L.R., RODRIGUE, G.Q. S, BRITO, I.R., ROSSETTO, R., SARAIVA, M.V.A., CAMPELLO, C.C., LOBO, C.H., SOUZA, C.E.A., MOURA, A.A.A., DONATO, M.A.M., PEIXOTO, C.A., FIGUEIREDO, J.R. . The effects of epidermal growth factor (EGF) on the *in vitro* development of isolated goat secondary follicles and the relative mRNA expression of EGF, EGF-R, FSH-R and P450 aromatase in cultured follicles. **Res in Vet Sci**; V 94, 3, P 453–461, 2013.

SURAI, A.P.; SURAI, P.F., STEINBERG, W.; WAKEMAN, W.G.; SPEAKE, B.K.; SPARKS, N.H.C. Effect of canthaxanthin content of the maternal diet on the antioxidant system of the developing chick. **British Poultry Science**, v. 44, n. 4, p. 612–619, 2003.

TAN, C.; XUE, J.; ABBAS, S.; FENG, B.; ZHANG, X.; XIA, S. Liposome as a delivery system for carotenoids: comparative antioxidant activity of carotenoids as measured by ferric reducing antioxidant power, DPPH assay and lipid peroxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 6726–6735, 2014.

Taniguchi F, Couse JF, Rodriguez KF, Emmen JMA, Poirier D, Korach KS. Estrogen receptor- α mediates an intraovarian negative feedback loop on thecal cell steroidogenesis via modulation of Cyp17 α 1 (cytochrome P450, steroid 17 α -hydroxylase/17,20 lyase) expression. **FASEB J**, v.21, p.586-595, 2007.

TILLY, J. L.; TILLY, K. I. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. **Endocrinology**, v.136, p.242–252, 1995.

TOYODA T, NAKAMURA K, YAMADA K, *et al.* SNP analyses of growth factor genes EGF, TGF- β 1, and HGF reveal haplotypic association of EGF with autism. **Biochem Bioph Res Commun**. v. 360, p.715-720, 2007.

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

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 100-109, 2008.

VORONINA, E; WESSEL G.M. The regulation of oocyte maturation. **Current Top Development Biology**, v.58, p.53-110, 2003.

WANI, A. R. *et al.* Effect of cysteamine and epidermal growth factor (EGF) supplementation in maturation medium on *in vitro* maturation, fertilization and culturing of embryos in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 106, n. 2–3, p. 160–164, ago. 2012.

WATSON, A. J.; Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence. **Journal of Animal Science** , v.85, n.13, p.E1- E3, 2007.

WESSEL, G. M., BROOKS, J. M., GREEN, E., HALEY, S., VORONINA, E., WONG, J., ZAYDFUDIM, V., CONNER, S.; The biology of Cortical Granules. **International Review of Cytology**, v.209, p.117-206, 2001.

WHITAKER BD, KNIGHT JW. Exogenous γ -glutamyl cycle compounds supplemented to *in vitro* maturation medium influence *in vitro* fertilization, culture and embryos parameters of porcine oocytes and embryos. **Theriogenology**, v.62, p.311-322, 2004.

WILDING, M., DALE, B., MARINO, M., DI MATTEO, L., ALVIGGI, C., ISATURO, M. L., LOMBARDI, L., DE PLACIDO, G; Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. **Human Reproduction**, v.16, p.909-917, 2001.

ZHANG, W.; ZHANG, K. Y.; DING, X. M.; BAI, S.P.; HERNANDEZ , J. M.; YAO, B.; ZHU, Q. Influence of canthaxanthin on broiler breeder reproduction, chick quality, and performance. **Poultry Science**, v. 90, p. 1516–1522, 2011.

6. ARTIGO CIENTÍFICO

EFEITO DE DIFERENTES MEIOS SOB A MATURAÇÃO E CLIVAGEM DE OÓCITOS CAPRINOS

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes substâncias acrescidas ao meio TCM 199 sob a maturação e posterior clivagem de oócitos caprinos provenientes de matadouros. Foram utilizados um total de 931 oócitos, divididos em duas etapas. A qualidade oocitária foi analisada através da taxa de maturação e posterior clivagem. Os oócitos foram divididos em três tratamentos conforme a composição do meio de maturação. T1: composto de TCM 199 + Bicarbonato acrescido de: LH (5 mg/mL) + FSH (1 µg/mL) + Sulfato de amicacina (83,4 µg/mL) + Piruvato (22 µg/mL) + 10% SFB; T2: TCM 199 + Bicarbonato acrescido de: EGF (0,52 µg/mL) + Cysteamina (10 ng/mL) + Gentamicina (57 µg/mL), e T3, TCM 199 + Bicarbonato acrescido de: EGF (0,52 µg/mL) + Cysteamina (10 ng/mL) + Gentamicina (57 µg/mL) + Cysteina (10 ng/mL) + Acido Ascórbico (100 ng/mL). Utilizou-se ANOVA com o modelo linear geral (general linear model) com distribuição binária e o teste dos quadrados médios mínimos (LSMEANS) na comparação múltipla Pos-Hoc. Para estudar a influencia dos meios de maturação sobre as fases da clivagem em oócitos maturados e fecundados *in vitro*, procedeu-se mediante ANOVA de Kruskal-Wallis com o Test de Wilcoxon e o teste de comparação múltipla de ranks de Dwass, Steel, Critchlow-Fligner. Após 26 horas de maturação, o estágio que ocorreu em maior proporção nos três tratamentos (T1: 61,06; T2: 63,06 e T3: 64,36%) foi a metáfase II, com porcentagens similares ($p > 0,05$) entre os tratamentos, assim como para todos os estágios de divisão nuclear. Do mesmo modo, a taxa de clivagem de oócitos (T1: 34,16; T2: 33,33 e T3: 32,51%), demonstraram valores similares ($p > 0,05$) entre tratamentos. Conclui-se que os três tratamentos fornecem ambiente propício para maturação de oócitos caprinos.

Palavras-chave: PIVE, caprinos, meio de maturação.

EFFECT OF DIFFERENT MATURATION MEDIUMS UNDER THE MATURATION AND CLEAVAGE RATES OF GOAT OOCYTES

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of different substances added to TCM 199 media to measure maturation and subsequent cleavage of goat oocytes obtained in local slaughterhouses. A total of 1121 oocytes were used divided into three stages. The oocyte quality was analyzed by the maturation rate and subsequent cleavage. The oocytes were divided into three treatments according to the composition of the maturation medium. T1: TCM 199 + Bicarbonate compound plus: LH (5 mg/mL) + FSH (1 µg/mL) + Amicacin sulfate (83.4 µg/mL) + Pyruvate (22 µg/mL) + 10% SFB; T2: TCM 199 + Bicarbonate compound plus: EGF (0.52 µg/mL) + Cysteamine (10 ng/mL) + Gentamicin (57 µg/mL), and T3, TCM 199 Bicarbonate compound plus: EGF (0.52 µg/mL) + Cysteamine (10 ng/mL) + Gentamicin (57 µg/mL) + Cysteine (10 ng/mL) + Ascorbic acid (100 ng/mL). ANOVA was used with the general linear model with binary distribution and the least squares test (LSMEANS) for multiple Pos-Hoc comparison. In order to study the influence of the maturation media on the cleavage phases in mature and fertilized oocytes *in vitro*, Kruskal-Wallis ANOVA was performed with the Wilcoxon Test and the multiple rank comparison test of Dwass, Steel, Critchlow- Fligner. After 26 hours of maturation, the highest proportion stage that occurred over the treatments was Metaphase 2 (T1: 61.06, T2: 63.06 and T3: 64.36%), with similar percentages ($p > 0.05$) between treatments, as well as for all stages of nuclear division. Similarly, the presence of polar corpuscle (T1: 33.68, T2: 32.63 and T3: 33.68%) and oocyte cleavage rate (T1: 34.16, T2: 33.33 and T3: 32.51%), showed similar values ($p > 0.05$) between treatments. It can be concluded that all three treatments provide a favorable environment for maturation of goat oocytes.

Key words: PIVE, goats, maturation medium.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento socioeconômico de uma região depende de uma série de fatores interligados. Em regiões em que a agricultura é inexistente em virtude das condições climáticas a criação de pequenos ruminantes é uma alternativa forte e bastante eficaz. Estes animais sem sombra de dúvidas vêm a enriquecer de forma satisfatória o desenvolvimento socioeconômico da região. O rebanho caprino brasileiro é de 10.046.888 cabeças, sendo que 9.331.460 (92,88%) deste total encontra-se na região Nordeste sendo 1.533.132 (15,26%) no estado de Pernambuco, (IBGE, 2017).

Os instrumentos biotecnológicos representam avanços nítidos acerca do controle de qualidade dos animais, sobretudo para a produção de carne, pele e leite, alavancados pela constante procura mercadológica por métodos eficientes e céleres. O agronegócio investe em pesquisas científicas, em especial às técnicas de fertilização. Observa-se, hoje, a produção *in vitro* (PIV) de embriões como uma técnica laboratorial em amplo crescimento, vez que aumenta o potencial genético do rebanho, abrevia o intervalo entre gerações e intervenção em problemas reprodutivos, em especial àqueles apresentados pelas fêmeas caprinas (PARAMIO, 2010).

A produção *in vitro* de embriões caprinos abrange as fases de maturação de oócitos primários, fertilização de oócitos *in vitro* e o cultivo de embriões até o estágio de blastocisto, com posterior transferência para as fêmeas receptoras (CARNEIRO, 2007). Tais etapas, contudo, sofrem a influência de fatores oriundos do meio em que são desenvolvidas, o que motivou a procura de influenciadores que, ao serem introduzidos às técnicas, permitissem maiores probabilidades de sucesso tanto no procedimento de maturação, fertilização e cultivo dos embriões produzidos.

A maturação oocitária (MIV) é uma etapa crucial e limitante para o sucesso da produção *in vitro* (CROCOMO *et al.*, 2011) e carece de maiores meios interventivos, de forma a garantir o sucesso, não apenas na manutenção da normalidade do procedimento, como também ampliando suas possibilidades de sucesso por meio de introdução de substâncias no processo de maturação de oócitos caprinos. Tal técnica consiste num método abrangente e cientificamente viável, diante da diversidade de materiais que

podem ser introduzidos, bem como a gama de escolha de substâncias, a depender do resultado inquirido ao procedimento.

O sucesso na produção *in vitro* de embriões, está em reproduzir de forma fidedigna a condição *in vivo*. Desse modo, os processos de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* de embriões têm demonstrado resultados significativos pela adição de vitaminas, fatores de crescimento e outros micronutrientes, (PAULA-LOPES *et al.*, 1998; REZAEI *et al.*, 2003; CAVALCANTE NETO, 2004; LIMA *et al.*, 2004; 2006). Estudos em bovinos têm sido feitos usando a adição de substâncias, como gonadotrofinas, estradiol, vitaminas e fatores de crescimento aos meios de cultivo os quais tem tido resultados positivos sob a taxa de blastocistos, (MOTAGNER,1999; BORTOLOTTI, 2000; ALVES *et al.*, 2001; LIMA 2004; LIMA *et al.*, 2004;2006).

Pesquisas têm sido realizadas buscando melhorar o meio de maturação de oócitos caprinos. Desse modo, objetivou-se avaliar o efeito de diferentes substâncias sob a maturação e a clivagem de oócitos caprinos provenientes de matadouros.

MATERIAL E MÉTODOS

Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução e Melhoramento Animal, da estação Experimental do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), localizado no município de Arcoverde, Pernambuco.

Obtenção dos ovários

Os ovários caprinos foram coletados nos matadouros dos municípios de Arcoverde e Brejo da Madre de Deus, imediatamente após o abate, e transportados até o laboratório em garrafa térmica contendo solução fisiológica a 0,9% e 30 mg/mL de sulfato de gentamicina, à temperatura de 37°C.

Recuperação e seleção dos oócitos

No laboratório, os ovários foram transferidos para um Becker e colocados em banho maria à 37°C. Os folículos entre 3 a 8 mm de diâmetro foram aspirados com

seringa de 10mL e agulha hipodérmica 18 G e o fluido obtido colocado em tubo cônico de 50 mL contendo PBS. Após 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e, adicionados 10 mL de PBS ao tubo e o conteúdo colocado em uma placa de Petri com fundo riscado para facilitar a recuperação dos complexos cumulus–oócito (COC's), com auxílio de estereomicroscópio (SMZ-745, Nikon, Tóquio, Japão). Foram utilizados apenas os COC's com citoplasma homogêneo e pelo menos uma camada de células do cumulus compacta.

Maturação in vitro_ MIV

Na primeira etapa, foram utilizados 325 oócitos, divididos nos três tratamentos (T1, 113) (T2, 111); (T3, 101), T1: Base TCM 199 + Bicarbonato acrescido de: LH (50 $\mu\text{L}/\text{mL}$) + FSH (1 $\mu\text{L}/\text{mL}$) + Amicacina (5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) + Piruvato (2 $\mu\text{L}/\text{mL}$) + 10% SFB; T2: Base TCM 199 + Bicarbonato acrescido de: EGF (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$) + Cysteamina (1 $\mu\text{L}/\text{mL}$) + Gentamicina (5 $\mu\text{L}/\text{mL}$), e T3: Base TCM 199 + Bicarbonato acrescido de: EGF (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$) + Cysteamina (1 $\mu\text{L}/\text{mL}$) + Gentamicina (5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) + Cysteina (1 $\mu\text{L}/\text{mL}$) + Ac.AScorbato (1 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Após 26 horas de maturação, os oócitos foram retirados da estufa e lavados em PBS onde as células do *cumulus* foram removidas mecanicamente por meio de pipeta. Individualmente os oócitos foram colocados em lâminas, entre linhas de vaselina distribuídas longitudinalmente e cobertos com a lamínula, pressionando de forma delicada até promover o achatamento dos oócitos. Em seguida a ponta da lâmina/ lamínula com os oócitos foi colocada na solução de fixação (AC - Acético: Etanol, 1:3, em que ficaram por um período de 36 horas em temperatura ambiente.

Após esse, tempo as lâminas e lamínulas foram submersas em solução de etanol absoluto por 5 a 10 minutos para retirada de impurezas, e adicionada uma gota de 15 μL de lacmoide próximo ao espaço entre lâmina e lamínula para permitir a entrada do mesmo por capilaridade. A seguir a amostra foi avaliada em microscópio óptico com filtros de contraste de fase, para verificação do estágio de maturação nuclear (Metáfase I; anáfase I; telófase I; metáfase II).

Para analisar a taxa de clivagem, um total de 606 oócitos distribuídos nos tratamentos: (T1 207); (T2 202); (T3 197), os quais foram lavados em três gotas de

meio FIV e acondicionados na proporção de 15 oócitos por gota de 100 μL . Para a fertilização, os espermatozoides foram provenientes de sêmen criopreservado de um único reprodutor, selecionados pelo gradiente de Percoll (90/45%) após centrifugação a 9000G por 10 minutos.

Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado e 70 μL do pellet colocado em 500 μL de meio FIV para outra centrifugação durante 4 minutos a 1.700 RPM. Após esta última centrifugação, foi retirado 5 μL do pellet e foi colocado em 95 μL de meio FIV para avaliar a motilidade e, 5 μL em 95 μL de água destilada para fazer a concentração espermática. Esta foi alcançada através de um cálculo feito com base na motilidade espermática e concentração de espermatozoides na câmara de Neubauer. Para fertilização, foi adicionado à gota contendo os oócitos a dose de 2 milhões de espermatozoides por mL.

Fertilização in vitro_ FIV

Após 18 horas da fertilização os oócitos foram lavados em três gotas de meio FIV para desenvolvimento de embriões e colocados em uma gota com 50 μL na incubadora para observação do desenvolvimento e clivagem. Passado 48 horas foi observada a taxa de clivagem em todos os tratamentos.

Análise estatística

Para verificar a influência dos tratamentos na taxa de maturação e clivagem de oócitos caprinos, utilizou-se o PROC GLIMMIX do SAS, de acordo a metodologia de BUELL *et al.* (2015), especificando distribuição binária no seu estágio, sendo clivado (1) ou não (0), já que o número de ocorrências em um determinado espaço temporal é dado por uma variável nominal. Para verificar a influência dos tratamentos na fase do oócito maturado e fecundado in vitro, estas características foram analisadas como variáveis qualitativas ordinais usando ANOVA para dados não paramétricos com o PROC NPAR1WAY do SAS. Todos os procedimentos estatísticos foram desenvolvidos com 95% de confiança.

RESULTADOS

Quando observado os estágios de divisão nuclear, foi constatado que após 26 horas de maturação, a Metáfase 2, foi o estágio que ocorreu em maior proporção nos três tratamentos (T1: 61,06; T2: 63,06 e T3, 64,36%) não havendo diferença estatística entre os três tratamentos em todos os estágios de divisão nuclear (Tabela 1).

Tabela 1. Influência de diferentes meios de maturação sob os estágios de divisão nuclear por tratamento após maturação *in vitro*

Tratamento (n)	Anormal (n)	Sem ID (n)	VG (n)	Metáfase I (n)	Anáfase I (n)	Telófase I (n)	Metáfase II (n)
T1 (113)	1.77% (2)	4.42% (5)	3.54% (4)	22.12% (25)	6.19% (7)	0.88% (1)	61.06% (69)
T2 (111)	0.00% (0)	6.31% (7)	1.80% (2)	16.22% (18)	9.01% (10)	3.60% (4)	63.06% (70)
T3 (101)	0.00% (0)	2.97% (3)	6.93% (7)	15.84% (16)	7.92% (8)	1.98% (2)	64.36% (65)

Resultados médios (%) seguidos de letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente.

Ao se avaliar a taxa de clivagem de oócitos maturados em meios de maturação diferentes e fertilizados pelo mesmo reprodutor, não foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Influência de diferentes meios de maturação sob a clivagem de oócitos por tratamento após maturação *in vitro*

Tratamento (n)	Oócito	
	Clivado (n)	Não clivado (n)
T1 (207)	45,41 % (94)	54,59 % (113)
T2 (202)	48,02 % (97)	51,98 % (105)
T3 (197)	43,65 % (86)	56,35 % (111)

Resultados médios (%) seguidos de letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente.

DISCUSSÃO

A maturação de oócitos *in vitro* é amplamente realizada com o TCM-199 suplementado com L-glutamina, piruvato, hormônios como FSH, LH, estradiol e antibióticos (CHAVES, *et al.*, 2010). Em caprinos, vários grupos de pesquisa também utilizam esta formulação como padrão (COGNIÉ e BARIL, 2002; COGNIÉ *et al.*, 2003; BALDASSARRE e KARATZAS, 2004; PARAMIO, 2010). Na presente pesquisa, oócitos caprinos foram maturados em meio TCM-199 com adição de diferentes substâncias em cada um dos tratamentos, o que resultou em taxas similares de maturação nuclear e clivagem ($p > 0,05$). Com isso levantando três pontos de suma relevância: O primeiro corresponde que a maturação dos oócitos caprinos *in vitro*, pode ser desenvolvida na ausência de uma fonte proteica no meio TCM-199. O segundo refere-se à capacidade de maturação e na ausência de gonadotrofinas, FSH e LH, atingindo estágios de maturação nuclear (Metáfase II) e, finalmente; o terceiro ponto é o desenvolvimento do oócito na ausência de antioxidantes. A utilização de antioxidantes na maturação *in vitro* de oócitos tem sido estudada amplamente, confirmando seu efeito positivo (BARAKAT *et al.*, 2014; LIMA-VERDE *et al.*, 2009; LV *et al.*, 2010; MUKHERJEE *et al.*, 2014; SALIMI *et al.*, 2014; SOTO-HERAS *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2013).

O meio TCM 199 foi usado como base em todos os tratamentos, nos quais se observaram taxas de maturação significativas com valores de 61,06; 63,00 e 64,36% para T1, T2 e T3, respectivamente, no estágio de Metáfase II. Os resultados foram inferiores aos encontrados por (GULER *et al.*, 2000) em oócitos de ovinos, onde a adição de FSH no meio de maturação contendo TCM 199 aumentou a taxa de oócitos em Metáfase II (87%) quando comparado com os meios sem a utilização do FSH (58%).

A maturação oocitária é caracterizada pela quebra da vesícula germinal, a formação do primeiro fuso meiótico na Metáfase I, a expulsão do primeiro corpo polar na Metáfase II, ocorrendo em folículos pré-ovulatório em resposta ao aumento de gonadotrofinas, resultando na ovulação de um oócito fertilizável (CROZET *et al.* 1995), Nesse sentido, no que concerne ao acréscimo de gonadotrofinas, FSH e LH no T1, estas

não interferiram no aumento das taxas de maturação quando comparados aos resultados do T2 e T3. Segundo Younis e Brackett (1992), a adição de FSH e LH ao meio de maturação promovem certa melhora na expansão das células do *cumulus oophorus*. Neste contexto, o FSH estimula a produção de substâncias sinalizadoras pelas células somáticas que induzem à retomada da meiose, e estimulam a expansão do *cumulus*, portanto, facilitando os processos de fertilização e desenvolvimento embrionário, (CHAVES *et al.*, 2012; GRAFF *et al.*, 1999; LEITÃO *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2012).

A concentração de FSH no presente estudo foi diferente daquelas de estudos anteriores. Utilizou-se 1µg/mL deste hormônio, enquanto outros estudos utilizaram concentrações de FSH que variaram de 0,5 a 25 µg/mL (FUKUI e ONO, 1989; DOMINKO e FIRST, 1992; YANG *et al.*, 1993). Alguns estudos evidenciaram que, apesar da utilização do LH no meio de cultura não afetar a maturação oocitária, a taxa de fecundação e a competência de desenvolvimento embrionário de oócitos imaturos são incrementadas (MOOR e TROUNSON, 1977; DOMINKO e FIRST, 1992). Contudo, o LH parece ser mais importante para maturação *in vitro* que o FSH, pois, quando se comparou separadamente os efeitos do FSH e LH na maturação, Dominko e First (1992) demonstraram que o LH promove maior taxa de maturação e obtenção de blastocistos.

Neste estudo foram adicionados ao T2 e T3 fatores de crescimento para melhorar o sistema de maturação. O fator de crescimento epidérmico (EGF) é o mais utilizado e demonstra bons resultados na taxa de maturação de oócitos caprinos (BORMANN *et al.*, 2003). Segundo Gilchrist e Thompson (2007), os mecanismos que governam a interrupção da atividade meiótica em oócitos de mamíferos têm sido estudados em grande detalhe, e há uma grande variedade de abordagens para que o oócito dê reinício artificialmente à meiose *in vitro*. Eppig e Downs (1987) determinaram em camundongos, um modelo induzido à maturação do oócito é bem estabelecido, no momento em que o recomeço da meiose é completamente inibida por purinas, tal como hipoxantina e, em seguida, um recomeço da meiose é induzida por FSH ou EGF. É possível o EGF utilizado nos meios tenha contribuído para as taxas de maturação observadas sendo estas similares aos resultados encontrado em estudos anteriores.

Por outro lado, em um estudo feito por Bolamba *et al.* (2006) em canídeos domésticos, verificou-se que o EGF não afetou a expansão das células do cumulus, bem como a maturação nuclear de oócitos maturados *in vitro*. Entretanto, quando este fator foi adicionado ao meio de cultivo contendo FSH e LH, verificou-se um aumento significativo na expansão dessas células. Adicionalmente, os mesmos autores determinaram em felídeos, que o EGF não induz a maturação nuclear, porém esta substância melhorou a maturação citoplasmática e a competência de desenvolvimento oocitário com conseqüente aumento na taxa de fecundação e desenvolvimento embrionário *in vitro* (MERLO *et al.*, 2005). Possivelmente, isto é, devido à presença de EGF, FSH e LH nos tratamentos, os quais poderiam ter melhorado as taxas de maturação, com resultados superiores aos de Bolamba *et al.* (2006) em canídeos domésticos.

No que se refere à dose utilizada do EGF 10 µL/mL, neste estudo, os resultados obtidos corroboram os de Lonergan *et al.* (1996), onde a suplementação com EGF em diferentes concentrações (1 - 100 ng/mL) ao meio de MIV em bovinos, estimulou a expansão das células do *cumulus*, aumentando a porcentagem de oócitos que atingiram o estágio de Metáfase II, bem como a proporção de embriões que chegaram ao estágio de blastocisto. Corroborando tal informação, Park (2004) afirmou que tais fatores de crescimento estão entre os estímulos mais potentes para expansão do *cumulus* e maturação de oócitos. Os mesmos autores relatam que, a importância fisiológica desta estimulação não era conhecida até saber a existência de ligados endógenos de EGFR, os quais eram desconhecidos.

Além da suplementação com tais componentes, outras pesquisas têm sido desenvolvidas com intuito de melhorar o meio de maturação de oócitos caprinos. A adição de tióis como cisteamina, 2- mercaptoetanol, cisteína, cistina e glutathione (GSH) foi testada por Matos *et al.* (2002) com intuito de proteger o oócito contra os efeitos de radicais livres oriundos do ambiente na estufa para MI, em virtude que durante a MIV, e no cultivo *in vitro* (CIV) são produzidos radicais livres nesta atmosfera. Nesse sentido, quando a produção destes compostos ocorre em níveis elevados, estes podem prejudicar o desenvolvimento dos oócitos e embriões. De acordo com Chwa *et al.* (2006), uma alternativa para melhorar o ambiente, e incrementar o número de oócitos e embriões

com taxas de desenvolvimento satisfatórias seria adicionar antioxidantes nos meios, consequentemente auxiliando na proteção contra o estresse oxidativo que ocorre durante o cultivo *in vitro*.

A adição da cisteamina no meio de cultivo melhorou a taxa de blastocistos caprinos, obtendo 22% de blastocistos, enquanto no meio de cultivo sem cisteamina a taxa de blastocistos foi de apenas 6,4% (RODRIGUEZ-GONZALÉZ *et al.*, 2003) foi observado em outro estudo que a adição de cisteamina no meio de cultura, melhorou a taxa de blastocistos caprinos, com taxa de obtenção de blastocistos de 22,2%, valor superior ao reportado sem sua utilização (6,4%) (RODRIGUEZ-GONZALÉZ *et al.*, 2003). Os autores adicionaram esta substância apenas durante a etapa de maturação, mas não em etapas posteriores. Por sua vez, De Matos *et al.* (2002) observaram melhores taxas de desenvolvimento embrionário quando os oócitos foram maturados na presença da cisteamina e o desenvolvimento embrionário demonstrou melhoras consideráveis durante a MIV e CIV. Segundo os autores, a elevação na concentração intracelular do oócito promovida pela cisteamina durante a MIV, tem papel crucial na proteção dos embriões contra os danos causados pelo estresse oxidativo.

Outro ponto que deve ser levado em consideração é a dose de cisteamina utilizada no cultivo de oócitos ou embriões. De Matos *et al.* (2002) avaliaram a dose efetiva de cisteamina durante a MIV e observaram maiores taxas de blastocistos após suplementação do meio de maturação com 50, 100 e 200 μ M deste antioxidante, sugerindo que, mesmo a concentração mais baixa (50 μ M) é benéfica, proporcionando melhores taxas de produção de blastocistos, no entanto a dose de 100 μ M pode aumentar ainda mais sua produção. Corroborando os resultados da literatura, poderia ser dito que a concentração usada na presente pesquisa, foi baixa 1 μ /mL. Em contraparte aos resultados de Balasubramanian e Rho (2007) ao cultivarem oócitos bovinos na presença de cisteamina, esta substância não afetou as taxas de maturação oocitária.

Outra substância que tem papel importante como antioxidante é o ácido ascórbico (AA) e sua concentração intracelular no oócito parece ser essencial para a maturação citoplasmática. A sua adição no meio de cultivo melhorou a produção de blastocistos em camundongos, como relatado na literatura (TILLY *et al.*, 1995; EPPIG *et al.*, 2000) e na maturação *in vitro* melhorou o potencial de desenvolvimento de

oócitos de suínos (TATEMOTO *et al.*, 2001; TAO *et al.*, 2010). Apesar de esse efeito não ter sido detectado em bovinos (DALVIT *et al.*, 2005), essa pode ser uma alternativa para melhorar as condições do ambiente *in vitro*, melhorando os resultados da PIVE.

Entretanto no presente estudo, a suplementação dos meios de maturação com antioxidantes no T1 e T2 não promoveu diferença nas taxas de maturação nuclear e posterior clivagem, o que sugere que não seria necessária a suplementação dos meios de maturação com os referidos antioxidantes. No entanto, a literatura descreve que a presença de antioxidante é essencial para a maturação de oócitos, particularmente para a maturação citoplasmática.

CONCLUSÃO

Na presente pesquisa, os três tratamentos com base o TCM 199 acrescidos de diferentes substâncias, não apresentou diferença estatística entre si de modo que os três meios mesmo com ausência de uma fonte proteica e, na presença de uma fonte de gonadotrofina, antioxidantes e fatores de crescimento, proporcionaram um ambiente favorável a maturação oocitária e posterior clivagem.

REFERÊNCIAS

- ALVES, N. G.; ZANGERONIMO, M. G.; OBERLENDER, G. LIMA, R. R.; CARVALHO, L. S. A.. **Adição do fator de crescimento semelhante à insulina I ou melatonina o meio de maturação de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico.** 2015. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras.
- BARAKAT, I. A. *et al.* Antioxidant effect of green tea leaves extract on *in vitro* production of sheep embryos. **Pak. J. Zool**, v. 46, p. 167–175, 2014.
- BORMANN, C. L.; ONGERI, E. M.; KRISHER, R. L. The effect of vitamins during maturation of caprine oocytes on subsequent developmental potential *in vitro*. **Theriogenology**, Estados Unidos, v. 59, p. 1373-1380, 2003.
- BUELL, M.; CHITWOOD, J. L.; ROSS, P. J. cAMP modulation during sheep *in vitro* oocyte maturation delays progression of meiosis without affecting oocyte parthenogenetic developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v. 154, p. 16–24, mar. 2015.
- CARNEIRO, G. F. Biotecnologia da reprodução na espécie caprina: perspectivas atuais
- CHAVES, R. N. *et al.* The Effects of Insulin and Follicle-Stimulating Hormone (FSH) During *In Vitro* Development of Ovarian Goat Preantral Follicles and the Relative mRNA Expression for Insulin and FSH Receptors and Cytochrome P450 Aromatase in Cultured Follicles1. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 3, 1 set. 2012.
- CROCOMO, L. F.; FILHO, W. C. M.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; BICUDO, S. D. aspectos bioquímicos e ultraestruturais da maturação oocitária. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 18, n.4, p. 542-552, 2011.
- GRAFF, K. J. *et al.* Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats. **Theriogenology**, v. 51, n. 6, p. 1099–1119, 1999
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística)- Sistema IBGE de Recuperação Automática. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/> Acessado em:08/MAIO/2017.

LEITÃO, C. C. F. *et al.* Goat ovarian follicles express different levels of mRNA for inhibin- β A subunit and activin-A stimulates secondary follicle growth *in vitro*. **Ciência Rural**, v. 43, n. 1, p. 107–113, jan. 2013.

LIMA-VERDE, I. B. *et al.* Effects of α -tocopherol and ternatin antioxidants on morphology and activation of goat preantral follicles *in vitro* cultured. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 57–65, fev. 2009.

LV, L. *et al.* Effect of oocyte selection, estradiol and antioxidant treatment on *in vitro* maturation of oocytes collected from prepubertal Boer goats. **Italian Journal of Animal Science**, v. 9, n. 1, p. e11, 1 jan. 2010.

LV, L. *et al.* Effect of oocyte selection, estradiol and antioxidant treatment on *in vitro* maturation of oocytes collected from prepubertal Boer goats. **Italian Journal of Animal Science**, v. 9, n. 1, p. e11, 1 jan. 2010.

MUKHERJEE, A. *et al.* Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 31, n. 2, p. 229–239, fev. 2014.

MUKHERJEE, A. *et al.* Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 31, n. 2, p. 229–239, fev. 2014.

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

PEREIRA, A. *et al.* Goat Oocyte Production by Standard or One-shot FSH Treatments and Quantitative Analysis of Transcripts for EGF Ligands and its Receptor after *In Vitro* Maturation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 2, p. 244–251, 1 abr. 2012.

Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.268-273, abr./jun. 2007.

SALIMI, M. *et al.* The Effect of Melatonin on Maturation, Glutathione Level and Expression of H MGB1 Gene in Brilliant Cresyl Blue (BCB) Stained Immature Oocyte. **Cell Journal (Yakhteh)**, v. 15, n. 4, p. 294–301, 2014.

SALIMI, M. *et al.* The Effect of Melatonin on Maturation, Glutathione Level and Expression of H MGB1 Gene in Brilliant Cresyl Blue (BCB) Stained Immature Oocyte. **Cell Journal (Yakhteh)**, v. 15, n. 4, p. 294–301, 2014.

Song HJ, Kang EJ, Maeng GH, Ock SA, Lee SL, Yoo JG, Jeon BG, Rho GJ. Influence of epidermal growth factor supplementation during *in vitro* maturation on nuclear status and gene expression of canine oocytes. *Res Vet Sci*, v.94, p.439-445, 2011.

SOTO-HERAS, S. *et al.* Beneficial effects of melatonin on *in vitro* embryo production from juvenile goat oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, 2017.

ZHANG, H. *et al.* Improving development of cloned goat embryos by supplementing α -lipoic acid to oocyte *in vitro* maturation medium. **Theriogenology**, v. 80, n. 3, p. 228–233, ago. 2013.