



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO DE RUMINANTES**

FABIANA DAKKACH DE ALMEIDA BARROS

**AVALIAÇÃO DA COMPETÊNCIA OOCITÁRIA BOVINA COM
AZUL CRESIL BRILHANTE**

Arapongas
2016

FABIANA DAKKACH DE ALMEIDA BARROS

**AVALIAÇÃO DA COMPETÊNCIA OOCITÁRIA BOVINA COM
AZUL CRESIL BRILHANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção de Ruminantes (Programa Associado entre Universidade Estadual de Londrina - UEL e Universidade Norte do Paraná - UNOPAR), como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde e Produção de Ruminantes.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Adona

Arapongas
2016

FABIANA DAKKACH DE ALMEIDA BARROS

**AVALIAÇÃO DA COMPETÊNCIA OOCITÁRIA BOVINA COM AZUL
CRESIL BRILHANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Saúde e Produção de Ruminantes (Programa Associado entre Universidade Estadual de Londrina (UEL) e Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde e Produção de Ruminantes.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Orientador Dr. Paulo Roberto Adona
Universidade Norte do Paraná

Prof. Dr. Werner Okano
Universidade Norte do Paraná

Prof^a. Dr^a. Mariana Ferreira de Almeida
Universidade Norte do Paraná

Arapongas, _____ de _____ de _____

Dedico este trabalho primeiramente a Deus pela saúde e coragem.

À minha família pela paciência, compreensão e força.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e capacitação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Roberto Adona, não só pela constante orientação neste trabalho, mas, sobretudo, pela sua amizade, carinho, compromisso e delicadeza que conduziu este estudo.

Aos professores Werner e Barca pela amizade, confiança, acessibilidade e comprometimento em fazer com que fosse possível.

Ao amigo Samuel Guemra pela atenção e ajuda no desenvolvimento do projeto.

À Agropecuária Laffranchi, à Universidade Norte do Paraná e Capes por conceder a infraestrutura e apoiar financeiramente este projeto.

A todos os professores que formam a equipe do mestrado de Saúde e Produção de Ruminantes

Aos meus pais, João e Nadia, pelo incentivo e por ter depositado muita confiança em mim.

À minha irmã Isabela, por ser minha força.

A toda minha família, incluindo tios, tias e avós pelas orações e torcida.

Às minhas amigas, pelos momentos de distração que me proporcionaram.

Enfim, agradeço a todos que estiveram presentes nesta minha trajetória acadêmica.

Muito obrigada!!!

*O que não enfrentamos em nós mesmos
encontraremos como destino.*

Carl Jung

BARROS, Fabiana Dakkach de Almeida. **Avaliação da Competência Oocitária Bovina com Azul Cresil Brilhante**. 2016. 44 fls. Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção de Ruminantes) – Universidade Norte do Paraná, Arapongas, 2016.

RESUMO

A biotécnica de produção *in vitro* de embriões precisa de oócitos competentes para a geração de embriões viáveis e para apoiar o desenvolvimento normal da prole. Para isso, os oócitos são selecionados com base em critérios morfológicos que por si só são insuficientes para selecioná-los em sua melhor competência. Com a necessidade de estabelecer opção não invasiva para seleção de oócitos, o presente estudo objetivou avaliar a competência de oócitos de folículos de diferentes diâmetros selecionados por critérios morfológicos e por meio da coloração azul cresil brilhante (BCB). Os ovários foram obtidos de fêmeas bovinas de abatedouro e os folículos de diferentes diâmetros (2-8, 2<4 e 4-8 mm) foram aspirados separadamente para obtenção dos oócitos. Os oócitos classificados morfológicamente como graus I e II foram incubados em solução de 26 µM de BCB, por 90 minutos em estufa de cultivo celular. Após serem avaliados como BCB+ (citoplasma azulado) e BCB- (ausência da coloração azulada) foram distribuídos para a maturação *in vitro* e para produção *in vitro* de embriões. A análise estatística foi feita pela ANOVA seguida pelo pós-teste de *Bonferroni* a 5% de significância. De acordo com os resultados, os oócitos provenientes de folículos com 4-8 mm de diâmetros obtiveram maior percentual de BCB+ (61%) e menor percentual de BCB- (39%) em comparação aos oócitos dos folículos de 2-8 (BCB+ 53% e BCB- 47%) e 2<4 (BCB+ 41% e BCB- 59%) mm de diâmetros. Os percentuais de maturação nuclear nos oócitos dos folículos de 2-8, 2<4 e 4-8 mm de diâmetros foram superiores (87, 77 e 89%) nos BCB+ em relação aos BCB- (76, 67 e 80%), respectivamente. Os oócitos, independentemente do tamanho dos folículos (2<4, 4-8 e 2-8 mm), BCB+, tiveram maior percentual (44, 67 e 58%) de blastocisto em comparação aos oócitos BCB- (34, 54, 40%), respectivamente. De acordo com os resultados, a avaliação com BCB pode ser utilizada como um método eficiente para a seleção de oócitos bovinos junto à avaliação morfológica. Além disso, oócitos, independentemente do tamanho dos folículos, BCB+, proporcionaram maior capacidade de maturação nuclear e desenvolvimento até blastocisto, aumentando os resultados da biotécnica de produção *in vitro* de embriões.

Palavras-chave: BCB, Embrião, Folículos, Maturação e Oócito.

BARROS, Fabiana Dakkach de Almeida. **Evaluation of Competencia Bovine Oocyte With Brilliant Cresyl Blue**. 2016. 44 fls. Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção de Ruminantes) – Universidade Norte do Paraná, Arapongas, 2016.

ABSTRACT

The biotechnical production in vitro embryo needs competent oocytes to generate embryos and viable to support normal development of the offspring. For this, oocytes are selected based on morphological criteria, which alone are sufficient to select them in your best competence. With the need for non-invasive option for selection of oocytes, this study aimed to evaluate the competence of follicle oocytes of different diameters selected by morphological criteria and by brilliant cresyl blue staining (BCB). Ovaries were obtained from slaughtered cows and follicles of different diameters (2-8, 2 <4 and 4-8 mm) were aspirated separately for obtaining oocytes. The oocytes morphologically classified as degree I and II were incubated in 26 uM solution of BCB for 90 minutes in cell culture incubator. After being assessed as BCB + (bluish cytoplasm) and BCB- (absence of blue staining) were distributed to the in vitro maturation and in vitro embryos. Statistical analysis was performed by ANOVA followed by Bonferroni post-test at 5% significance. According to the results, the oocytes from follicles 4-8 mm in diameter had a higher percentage of BCB + (61%) and lowest percentage of BCB- (39%) compared with oocytes from follicles of 2-8 (BCB + 53 BCB-% and 47%) and 2 <4 (BCB + 41% and 59% BCB-) mm in diameter. The nuclear maturation of oocytes from follicles in the percentage of 2-8, 2 <4 mm diameter and 4-8 were superior (87, 77 and 89%) in BCB + regarding BCB- (76, 67 and 80%), respectively. Oocytes regardless of the size of the follicles (2 <4, 4-8 and 2-8 mm), BCB +, had a higher percentage (44, 67 and 58%) compared to the blastocyst BCB- oocytes (34, 54, 40 %), respectively. According to the results, the evaluation with BCB can be used as an efficient method for the selection of oocytes with the morphological evaluation. Moreover, oocytes, regardless of the size of the follicles, BCB + showed higher capacity to nuclear maturation and development to the blastocyst stage, increasing the results of biotechnical production of embryos in vitro.

Keywords: BCB; Embryo; Follicles; Maturation; Oocyte.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagens ilustrativas dos preparativos para aspiração folicular (1), ovários selecionados para aspiração (2), medição do diâmetro dos folículos (3), aspiração folicular (4), seleção dos oócitos (5) e coloração dos oócitos com BCB (6).....	23
Figura 2 – Diagrama simplificado da avaliação da coloração com BCB, da maturação nuclear e da produção in vitro de embriões.....	27
Figura 3 – Avaliação da coloração com BCB em oócitos de folículos de diferentes diâmetros.....	29
Figura 4 – Imagens de oócitos submetidos à coloração com BCB. Complexo cumulus-oócito (1 e 2) e oócitos desnudos (3). As setas na cor azul indicam oócitos BCB+ e as setas em vermelho indicam oócitos BCB-. Coloração moderada (+) e alta (++) em oócitos BCB+ (3).....	30
Figura 5 – Avaliação da taxa de maturação nuclear de oócitos provenientes de folículos de diferentes diâmetros submetidos ao corante BCB. Metáfase I, anáfase I e telófase I (MI-TI) e metáfase II (MII).....	31
Figura 6 – Imagens de oócitos em estádios de vesícula germinativa (1), metáfase I (2), anáfase I (3), telófase I (4), metáfase II (5) e oócitos com o primeiro corpúsculo polar (6).....	31
Figura 7 – Imagens de embriões com oito dias pós-fecundação in vitro. Embrião em fase de eclosão (1) e embriões com aproximadamente 130 (2) e 270 (3) células.	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variação do percentual de intensidade da coloração de oócitos BCB+	30
Tabela 2. Avaliação da taxa de produção <i>in vitro</i> de embriões de oócitos selecionados por BCB de folículos de diferentes diâmetros.	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI – Anáfase I

ANOVA – Análise de variância

ATP – Trifosfato de adenosina

BCB – azul cresil brilhante

BCB- – BCB negativos

BCB+ – BCB positivos

Ca₊² – Cálcio

CIV – Cultivo *in vitro*

CO₂ – dióxido de carbono

COC – Complexo cumulus-oócito

CP – Corpúsculo polar

D – Dia

DNA – Ácido desoxirribonucléico

FCR – Força Centrífuga Relativa

FITC – Fluorescein isothiocyanate

FIV – Fertilização *in vitro*

'g' – Constante de gravitação universal

G6PDH – Glicose-6-fosfato desidrogenase

GC – Grânulos corticais

IP₃ – Trifosfato inositol

ITS – Insulina, transferrina e selênio

LH – Hormônio luteinizante

MEM – Meio mínimo essencial

Mg – miligramas

MI – Metáfase I

MII – Metáfase II

MIV – Maturação *in vitro*

mL – Mililitro

mm – Milímetros

NaCl – Cloreto de sódio

NAD⁺ – Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato oxidada

NADPH – Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato reduzida

Nm – Nanômetros

PBS – Tampão fosfato salina

PI – Prófase I

PIV – Produção de embrião

PVA – Álcool polivinílico

RE – Retículo endoplasmático

Ribose-5-fosfato – Açúcar composto por cinco carbonos

RNA_m – ácido ribonucléico mensageiro

SFB - – Soro fetal bovino

SOF – Fluido de oviduto sintético

TALP – meio tyrode's com albumina, lactato e piruvato

TI – Telófase I

UV – Ultravioleta

VG – Vesícula germinativa

α _MEM – *Alpha*-Minimum Essential Medium Eagle

μ g – Micrograma

μ L – Microlitro

μ M – Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVO	15
2.1. Objetivo Geral	16
2.2. Objetivos Específicos	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1. Maturação Oocitária	17
3.1.1. Maturação Nuclear	17
3.1.2. Maturação Citoplasmática	18
3.1.3. Maturação Molecular	19
3.2. Competência Oocitária	19
3.3. Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6pdh).....	20
3.4. Azul Cresil Brilhante (BCB)	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. Obtenção dos Oócitos	22
4.2. Coloração com Azul Cresil Brilhante (BCB)	22
4.3. Maturação <i>In Vitro</i>	23
4.4. Avaliação da Maturação <i>In Vitro</i>	24
4.5. Fecundação <i>In Vitro</i>	24
4.6. Cultivo <i>In Vitro</i>	25
4.7. Número de Células dos Embriões	26
4.8. Análise Estatística	26
4.8.1 Delineamento Experimental	26
4.8.1.1 Experimento 1 - Seleção de oócitos por coloração com BCB.....	26
4.8.1.2 Experimento 2 - Avaliação da intensidade da coloração dos oócitos BCB+	27
4.8.1.3 Experimento 3 – avaliação da taxa de maturação nuclear	28
4.8.1.4 Experimento 4 – avaliação da produção <i>In vitro</i> de embriões	28
5. RESULTADOS	29
5.1. Experimento 1.....	29

5.2 Experimento 2.....	29
5.3. Experimento 3.....	30
5.4. Experimento 4.....	32
6. DISCUSSÃO	33
7. CONCLUSÃO	37
8. REFERÊNCIAS.....	38

1. INTRODUÇÃO

Alguns fatores biológicos atuam em conjunto na finalidade de preparar o complexo *cumulus-oócito* (oócito) para o desenvolvimento até o estágio de blastocisto. Essa habilitação do oócito é progressivamente adquirida ao término da foliculogênese, quando várias alterações celulares e moleculares estão envolvidas na sua competência (Coticchio *et al.*, 2004; Sirard *et al.*, 2006; Nemcova *et al.*, 2016). Nessa fase ocorrem mudanças nucleares e citoplasmáticas, que podem interferir na eficácia da maturação, tais como a qualidade do ambiente folicular, tamanho do folículo, morfologia do complexo *cumulus-oócito* e condições de maturação (Dode, 2006; De Bem *et al.*, 2014; Shabankareh *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016). Portanto, a seleção de oócitos competentes é crucial para o sucesso da produção *in vitro* de embriões.

Para a classificação dos oócitos, utilizam-se alguns métodos no intuito de selecionar os melhores para aplicação nas biotécnicas de produção *in vitro* de embriões, mas certos pré-requisitos no método de seleção deveriam ser atendidos, como: ser método simples e rápido, de baixo custo e de alta confiabilidade e, acima de tudo, apresentar segurança em sua utilização, ou seja, não acarretar prejuízos aos oócitos (Goovaerts *et al.*, 2010; Bols *et al.*, 2012). Porém, considera-se que, até o momento, nenhuma técnica de seleção reúna todos esses fatores (Torner *et al.*, 2008; Goovaerts *et al.*, 2010).

A avaliação morfológica do oócito tem sido utilizada em larga escala, tanto para estudos de pesquisa laboratoriais quanto para estudos na área comercial de produção *in vitro* de embriões, mas, apesar de produzir resultados aceitáveis, com aproximadamente 80% de maturação nuclear e de 45% de produção de blastocistos (Pontes *et al.*, 2011; De Bem *et al.*, 2014; Bakri *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2016), não demonstra integralmente a qualidade do gameta feminino quanto à sua competência para maturar, clivar, fecundar, desenvolver até blastocisto, induzir a prenhez e levar o nascimento a termo (Dode, 2006; Sirard *et al.*, 2006). Por meio desse método, avalia-se a homogeneidade citoplasmática, a quantidade e a qualidade das células do complexo *cumulus-oócito* que recobrem o gameta feminino (Goovaerts *et al.*, 2010; Bakri *et al.*, 2016). Porém, apesar de amplamente usado, esse método é considerado

muito subjetivo e de relativa precisão, uma vez que alguns oócitos com morfologia normal estão em estágio inicial de degeneração (Manjunatha *et al.*, 2007), ocasionando heterogeneidade nos resultados e afetando a padronização de técnicas e de análise de substâncias usadas para melhoria da produção de embriões.

Desse modo, torna-se necessária a associação dos critérios morfológicos junto a métodos não invasivos para seleção dos melhores oócitos (Wu *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2009), como a aplicação do corante azul cresil brilhante (BCB). Os benefícios da seleção morfológica com a técnica de coloração com BCB apontam para facilidade de utilização, baixos custos e com bons resultados, uma vez que se tratam de metodologias simples e não prejudiciais ao desenvolvimento dos oócitos (Alcoba, 2013).

O emprego do corante BCB identifica a fase de desenvolvimento oocitário, por meio da metabolização dessa substância pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Conforme a competência oocitária vai progredindo, ocorrem alterações metabólicas na atividade de determinadas enzimas, como a G6PDH (Epstein *et al.*, 1969; Tsutsumi *et al.*, 1992; Mirshamsi *et al.*, 2013). Os oócitos provenientes de folículos no final do desenvolvimento apresentam menor atividade da enzima G6PDH quando comparados aos gametas femininos no início de seu desenvolvimento (Mangia e Epstein, 1975; Wang *et al.*, 2012), sendo possível identificar a fase em que o oócito se encontra, uma vez que o corante BCB é metabolizado e reduzido a um composto de coloração menos intensa pela enzima G6PDH.

Sendo assim, a coloração azulada no citoplasma do oócito corresponde a baixos níveis de atividade específica da enzima G6PDH, podendo ser classificados como BCB positivos; já a ausência da coloração azulada, podendo ser classificados como BCB negativos e alto nível de atividade da enzima G6PDH (Williams, 1986; Mirshamsi *et al.*, 2013).

Segundo alguns autores, (Ericsson *et al.*, 1993), (Pujol *et al.*, 2004), (Manjunatha *et al.*, 2007), (Alcoba, 2013), os oócitos classificados como BCB positivos apresentam maiores taxas de maturação nuclear e de produção *in vitro* de embriões quando comparados ao oócitos BCB negativos, ressaltando ainda mais a importância na seleção de oócitos competentes para o sucesso da produção *in vitro* de embriões.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a competência de oócitos de folículos de diferentes diâmetros (2<4, 4-8 e 2-8 mm) selecionados por meio da coloração azul cresil brilhante.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os oócitos dos folículos de 2<4, 4-8 e 2-8 mm diâmetros quanto à taxa de coloração com BCB.

Relacionar os diferentes diâmetros dos folículos aspirados com as taxas de maturação nuclear de oócitos selecionados por BCB.

Relacionar os diferentes diâmetros dos folículos aspirados com as taxas de produção *in vitro* de oócitos selecionados por BCB.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. MATURAÇÃO OOCITÁRIA

Algumas transformações ocorridas durante a maturação *in vivo* ou *in vitro* são fundamentais para o desenvolvimento oocitário, tornando o gameta apto a ser fecundado e ter um desenvolvimento embrionário subsequente (De Loos *et al.*, 1992; Hyttel *et al.*, 1997).

Para melhor entendimento das etapas primordiais para que um oócito torne-se competente em ser fecundado e desenvolver-se até blastocisto, (Sirard *et al.*, 2006) dividiram a maturação oocitária em três: a maturação nuclear, que compreende a retomada e a finalização da primeira divisão meiótica; a maturação citoplasmática, definida por modificações e migrações de organelas que ocorrem no citoplasma do oócito; a maturação molecular, que ocasiona transformações genômicas que regulam a expressão gênica.

3.1.1. MATURAÇÃO NUCLEAR

A maturação nuclear é caracterizada como avanço do núcleo oocitário imaturo em maturo, o qual envolve uma série de alterações que são estimuladas principalmente por hormônios gonadotróficos (Merton *et al.*, 2013). Sob a influência dos hormônios, o oócito recomeça seu ciclo celular progredindo da fase de diplóteno da prófase da primeira meiose (prófase I), passando pelos estádios de metáfase I, anáfase I, telófase I (término da primeira divisão meiótica) e progredindo até o estágio de metáfase da segunda divisão meiótica (Meinecke *et al.*, 2001). Ao término da primeira divisão meiótica, o citoplasma é dividido assimetricamente (Can *et al.*, 2003), gerando duas células de tamanhos diferentes: uma pequena chamada de corpúsculo polar e outra grande, o oócito secundário. Já ao término da maturação nuclear, o oócito permanece nesse estágio do ciclo celular (metáfase II) até a fecundação que vai promover o término da segunda divisão meiótica e liberação do segundo

corpúsculo polar, assim o futuro embrião prossegue seu ciclo celular por divisão mitótica (Sirard, 2001).

3.1.2. MATURAÇÃO CITOPLASMÁTICA

A maturação citoplasmática envolve a capacidade de sustentar a fertilização e o desenvolvimento embrionário por meio de modificações morfológicas no oócito. Tal capacidade é chamada de competência oocitária, mediante alterações na distribuição citoplasmática e na atividade de algumas organelas, como mitocôndrias, retículo endoplasmático e grânulos corticais (Yamada e Isaji, 2011).

As mitocôndrias têm considerável papel na produção de energia em forma de ATP. Possuem atividade crescente no decorrer da maturação, sendo menor em oócitos imaturos e aumentando progressivamente até o término da maturação com grande número de mitocôndrias ativas (Tarazona *et al.*, 2006). Mudanças na organização e distribuição das mitocôndrias também têm sido levadas em consideração, pois oócitos imaturos em estágio de vesícula germinativa apresentam grande quantidade das organelas na periferia do citoplasma e pequenos grupos no centro da célula, de modo que, no estágio de MII (maturados), essa organização se espalha por todo o citoplasma (Adona *et al.*, 2006).

O retículo endoplasmático (RE) tem importante função no armazenamento de íons, especialmente o cálcio (Ca^{+2}) e alterações na quantidade de receptores tipo I para trifosfato inositol (IP3) na sua membrana. No final do processo de maturação, essas alterações são importantes para que ocorram alternâncias na concentração e movimentação de Ca^{+2} ativando a formação embrionária depois da fertilização (Yamada e Isaji, 2011). O RE está mais presente na região central em oócitos imaturos e incidindo mais na região cortical em oócitos em MII (Yamada e Isaji, 2011).

Os grânulos corticais (GC) são vesículas secretórias oriundas do Aparelho de Golgi, presentes no citoplasma dos oócitos. Desenvolvem-se durante a formação do gameta feminino e são submetidos à reorganização no processo de maturação, além de evitarem a polispermia (Hyttel *et al.*, 1997). Nos oócitos imaturos, são identificados em agrupamentos no citoplasma, porém migram para periferia

conforme ocorre a maturação e são detectados no córtex, próximos à membrana plasmática (Mingoti *et al.*, 2009; Liu, 2011).

3.1.3. MATURAÇÃO MOLECULAR

A maturação molecular está relacionada com a síntese de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) específicos e proteínas, as quais acumulam-se no oócito no momento precedente à ovulação (Sirard *et al.*, 2006). Tais moléculas armazenadas atuam garantindo a maturação do oócito e o início do desenvolvimento embrionário (Sirard, 2001). A ativação do genoma embrionário ocorre após alguns ciclos celulares, é descrita como transmissão materno-zigótica e, tratando-se da espécie bovina, acontece em embriões no estágio de 8-16 células (Telford *et al.*, 1990). Desse modo, uma parcela do RNAm produzida na fase de crescimento oocitário começa a ser traduzida para sintetizar novas proteínas que terão importante função no avanço da maturação e do desenvolvimento embrionário inicial.

3.2. COMPETÊNCIA OOCITÁRIA

Competência oocitária é a definição para oócitos que concluem a meiose (maturação), clivam após fecundação, desenvolvem-se até blastocisto, induzem a prenhez e o nascimento de um indivíduo a termo (Sirard *et al.*, 2006). Grande parte dos oócitos recuperados a partir de folículos antrais é capaz de completar a maturação nuclear, aproximadamente 80%, porém menos da metade deles, aproximadamente 45%, chega ao estágio de blastocisto *in vitro* (Adona *et al.*, 2006; Guemra *et al.*, 2014). Essa diferença refere-se ao status da maturação citoplasmática e molecular, diferenciando os competentes e incompetentes nas fases subsequentes da produção *in vitro* de embriões (Donnison e Pfeffer, 2004; Sirard *et al.*, 2006).

3.3. GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6PDH)

Em contexto sucinto, a enzima G6PDH está envolvida na desidrogenação enzimática da glicose-6-fosfato e ao fim da reação obtém-se a nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e ribose-5-fosfato (Nelson e Cox, 2002). Mas essa enzima também está envolvida na degradação do composto BCB no citoplasma de oócitos de diferentes espécies (Bovinos, ovinos, suínos, entre outras), conforme descreve (Mirshamsi *et al.*, 2013). Como a enzima G6PDH atua sobre o BCB ainda não foi compreendida em sua totalidade (Alm *et al.*, 2005), sugeriram que o BCB funcionaria como um receptor de elétrons durante a oxidação da glicose-6-fosfato e redução de NAD⁺ durante a via da pentose fosfato.

A enzima G6PDH está ativa em oócitos em desenvolvimento, mas apresenta atividade reduzida em gametas que tiveram sua fase de crescimento concluída, demonstrando existir uma relação linear direta entre o desenvolvimento do oócito e a atividade da G6PDH, podendo ser utilizada como marcador da competência oocitária (Tsutsumi *et al.*, 1992).

3.4. AZUL CRESIL BRILHANTE (BCB)

O BCB é um composto eficaz em determinar a presença da G6PDH no citoplasma dos oócitos. A ação de degradação do BCB no interior da célula pela enzima G6PDH torna seu citoplasma com coloração menos intensa (Bhojwani *et al.*, 2007; Torner *et al.*, 2008; Mirshamsi *et al.*, 2013). (Alm *et al.*, 2005) demonstraram que oócitos bovinos BCB negativo apresentam 2,5 vezes mais atividade da enzima G6PDH quando comparados com oócitos BCB positivos.

Em suínos, os oócitos BCB+ apresentam maior volume citoplasmático e maior número de cópias de DNA mitocondrial que, por sua vez, está correlacionado com a competência oocitária, capacidade de fertilização e desenvolvimento embrionário, já que nas primeiras clivagens ocorre redistribuição das mitocôndrias pelos blastômeros (El Shourbagy *et al.*, 2006). Em outros parâmetros avaliados em oócitos de camundongos, BCB+ apresenta maior maturação citoplasmática, apontada

pela concentração intracelular de GSH e reorganização mitocondrial (Wu *et al.*, 2007). Nesse contexto, teste de seleção pela coloração BCB viabiliza a utilização dos oócitos em sua melhor competência (Roca *et al.*, 1998; Mirshamsi *et al.*, 2013).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO DOS OÓCITOS

No período de março de 2014 a dezembro de 2015, foram coletados aproximadamente 1500 ovários de fêmeas bovinas em matadouro frigorífico da região de Londrina, Paraná, para realização dos experimentos.

No decorrer do abate, os ovários foram acondicionados em uma garrafa térmica de 2,0 litros com solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) a aproximadamente 25°C de temperatura. No laboratório após 3 a 4 horas (abate e transporte), os ovários foram lavados em NaCl 0,9%, e os folículos ovarianos localizados na região cortical foram medidos com um paquímetro digital e classificados em diferentes tamanhos (2-8, 2<4 e 4-8 mm de diâmetros) e aspirados separadamente com auxílio de uma agulha (1,2 X 40 mm) conectada a uma seringa descartável de 10mL (Figura 1). O líquido folicular contendo os oócitos foi depositado em tubos cônicos de 50 mL, separados conforme o grupo a que pertenciam e mantidos em repouso para decantação por dez minutos. Ao *pellet* contendo os oócitos foram adicionados 5 mL de solução de TCM-199-HEPES (Gibco, 12340-030) suplementados com 50 µg/mL de gentamicina (Sigma, G1397), em uma placa de *Petri*, para a seleção dos oócitos sob estereomicroscópio (Nikon, SMZ1000). Somente oócitos classificados como graus I e II, contendo mais de três camadas de células do cumulus e citoplasma uniforme, foram utilizados para os experimentos.

4.2. COLORAÇÃO COM AZUL CRESIL BRILHANTE (BCB)

Os oócitos foram incubados separadamente (Figura 1), conforme o diâmetro a que pertenciam, em solução de α -MEM (Gibco, 41061-029) livre de vermelho fenol, suplementado com 0,1% de álcool polivinílico (PVA), 50µg/mL de gentamicina e 26 µM de BCB (Sigma, B5388), por 90 minutos em estufa de cultivo celular (38,5°C em atmosfera com 5% de CO₂ em ar e 100% de umidade relativa).

Decorrido o tempo de exposição, os oócitos foram lavados em três gotas de α -MEM e classificados como BCB+, quando apresentaram citoplasma azulado; ou como BCB-, quando não apresentaram coloração azulada. Os oócitos BCB+ foram avaliados quanto à intensidade da coloração azulada em moderada (+) e alta (++) . A classificação foi realizada por meio de avaliação sob estereomicroscópio com magnitude de 50x.

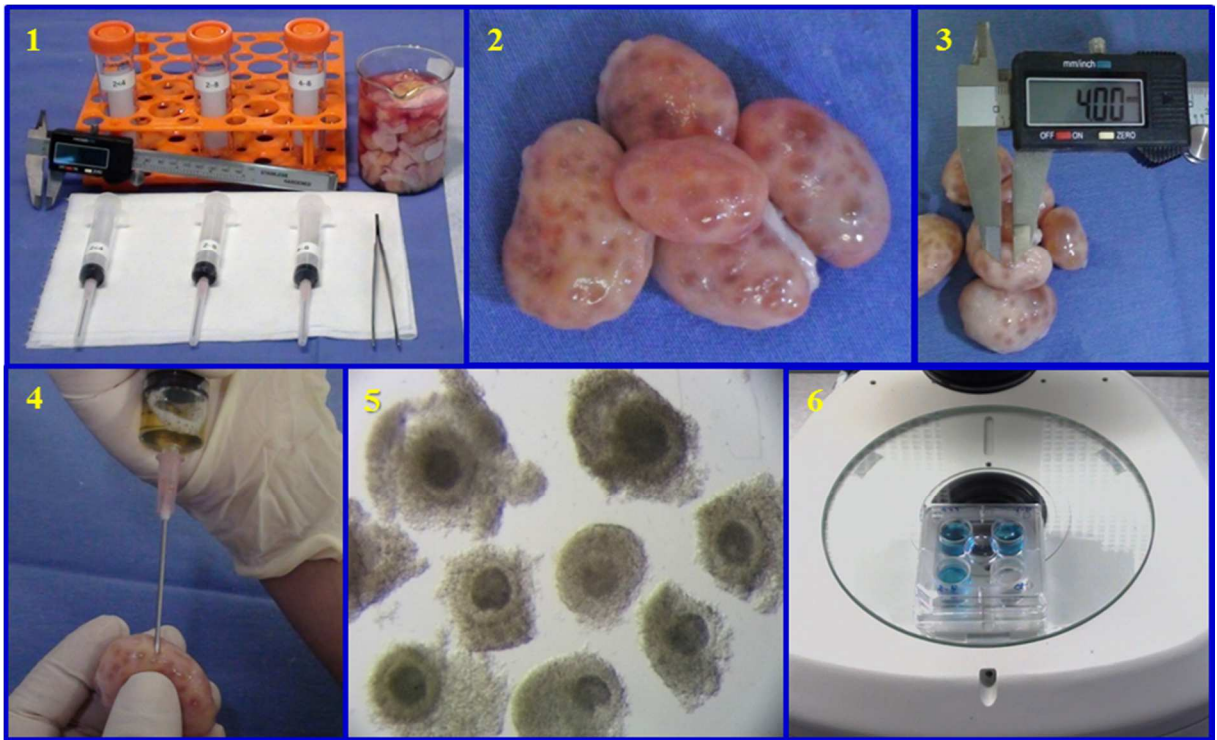


Figura 1 – Imagens ilustrativas dos preparativos para aspiração folicular (1), ovários selecionados para aspiração (2), medição do diâmetro dos folículos (3), aspiração folicular (4), seleção dos oócitos (5) e coloração dos oócitos com BCB (6).

4.3. MATURAÇÃO *IN VITRO*

Após a classificação em BCB+ e BCB-, os oócitos foram transferidos separadamente conforme o diâmetro dos folículos e a coloração para o meio de maturação *in vitro*, constituído pelo meio de cultivo celular TCM-199 (Gibco, 11150-059) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Sigma, F0804), 5,0 μ g/mL de

LH (Lutropin-v, Vetrepharm), 0,5µg/mL de FSH (Folltropin-v, Vetrepharm), 0,2µM de piruvato, 100µM de cisteamina (Sigma, C8397) e 50µg/mL de gentamicina.

Os grupos de oócitos foram maturados *in vitro* por 22 horas, em gotas de 100µL de meio de maturação sob óleo mineral (Sigma, M8410), montadas em placa de *Petri* (Corning, 430166), a 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar e 100% de umidade relativa. Cada gota de maturação *in vitro* continha aproximadamente 20 oócitos.

4.4. AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO *IN VITRO*

Para avaliação da maturação *in vitro*, os oócitos foram desnudados (remoção das células do *cumulus*) em tubo de 5 mL com 0,3 mL de PBS (tampão fosfato salino) acrescida de 0,1% de PVA e agitados no “vortex” por quatro minutos. Os oócitos desnudos foram fixados em PBS suplementado com 0,1% de PVA; 3,7% de paraformaldeído e 0,6% de Triton X-100 por 30 minutos; lavados três vezes em PBS-PVA (PP); bloqueados em PP com 3% de soro de cabra (Sigma, G9023) por 45 minutos; corados em PP com anticorpo (1:100) anti-alfa tubulina conjugada com FITC (Sigma, F2168) por uma hora; lavados por três vezes em PP; corados em PP com 10 µg/mL iodeto de propídio (Sigma, P4170) por 10 minutos; lavados três vezes em PP e montados entre lâmina e lamínula com *Vectashield* para a avaliação sob microscópio de epifluorescência. Os oócitos foram fotografados (Infinity câmera - software V6.2.0) no microscópio de epifluorescência (Eclipse Ti Nikon - filtros UV-2A B-2E/C, 346-460nm e 495-519nm de absorção/emissão, respectivamente) para serem classificados de acordo com a configuração nuclear em vesícula germinativa (VG), metáfase I (M I), anáfase I (A I), telófase I (T I) e metáfase II (M II).

4.5. FECUNDAÇÃO *IN VITRO*

Foi utilizado sêmen congelado de um único touro da raça Nelore, com palhetas de uma mesma partida e de fertilidade conhecida, proveniente de Central de

Produção e Tecnologia de sêmen, foi descongelado em banho-maria a 36°C por um período de 30 segundos e processado por meio da metodologia de gradiente de densidade. Em um tubo de microcentrífuga, foram adicionados 400µL de BoviPure (Nidacon) a 90% e sobre este 400µL de BoviPure a 45%, formando um gradiente de densidade no qual o sêmen foi depositado sobre a coluna do gradiente e centrifugado por cinco minutos a 800 FCR (Força Centrífuga Relativa). O *pellet* foi diluído em 1 (um) mL de meio de fecundação (Parrish *et al.*, 1988) suplementado com 2µM de penicilamina, 1µM de hipotaurina, 250µM de epinefrina, 20µg/mL de heparina e 6mg/mL de albumina sérica bovina (BSA - Sigma, A8808) e centrifugado por dois minutos a 200 FCR. Após esse procedimento, o *pellet* foi usado para fecundação a uma concentração final de 2×10^6 espermatozoides/mL. Os oócitos e espermatozoides foram coincubados em gotas de 100µL de meio de fecundação sob óleo mineral, montadas em placa de *Petri*, por um período de 18 h, a 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar a 100% de umidade.

4.6. CULTIVO *IN VITRO*

Após a fecundação, os oócitos foram parcialmente desnudados com auxílio de um micro-pipetador e transferidos para o meio de cultivo *in vitro*. O cultivo foi realizado com Fluido Sintético do Oviduto (Holm *et al.*, 1999), suplementado com 2% de solução de BME (Sigma, B6766) e 1% de solução de MEM (Sigma, M7145), 0,34 mM de citrato trissódico, 2,77 mM de mioinositol, 3% de SFB, 4 mg/mL de BSA, 0,75 mg/mL de glicina, 0,15 mg/mL de alanina e 0,09 mg/mL de glutamina, em monocamada de células somáticas (Guemra *et al.*, 2013) e mantidos por oito dias em estufa a 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar a 100% de umidade relativa. No segundo dia de cultivo, foi avaliada a taxa de clivagem; no sétimo dia foi avaliada a taxa de blastocistos; no oitavo dia, a taxa de eclosão dos embriões.

4.7. NÚMERO DE CÉLULAS DOS EMBRIÕES

Para avaliação do número de células dos embriões eclodidos no oitavo dia após fecundação *in vitro*, os embriões foram expostos ao corante Hoechst (33342), na concentração de 1µg/mL em PBS-PVA, e incubados por 10 minutos, protegidos da luz. Após esse período, foram lavados por três vezes em PBS-PVA e fixados entre lâmina e lamínula para avaliação quanto ao número de células. Os embriões foram fotografados (Infinity câmera - software V6.2.0) no microscópio de epifluorescência (Eclipse Ti Nikon - filtro UV-2A, 330-380/420-700nm de absorção/emissão) para contagem do número de células.

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis (Taxa de BCB, Maturação nuclear e da produção *in vitro* de embriões) foram analisadas com programa BioEstats 4.0 (Ayres *et al.*, 2005), aplicado ANOVA seguida pelo pós-teste de *Bonferroni* a 5% de significância.

4.8.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.8.1.1 EXPERIMENTO 1. SELEÇÃO DE OÓCITOS POR COLORAÇÃO COM BCB

Nesse experimento foram utilizados 2958 oócitos de folículos de diferentes diâmetros (item 4.1) em seis repetições (Figura 2). Para a avaliação os oócitos foram incubados em solução de α -MEM com 26 µM de BCB por 90 minutos em estufa de cultivo celular. Decorrido o tempo de exposição ao BCB, os oócitos foram classificados como BCB+ ou BCB-.

4.8.1.2 EXPERIMENTO 2. AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DA COLORAÇÃO DOS OÓCITOS BCB+

Nesse experimento foram utilizados 458 oócitos de folículos de diferentes diâmetros (item 4.1) em quatro repetições (Figura 2) para avaliar a intensidade da coloração de oócitos BCB+. A intensidade da coloração nos oócitos BCB+ foi determinada como moderada (+) e alta (++)

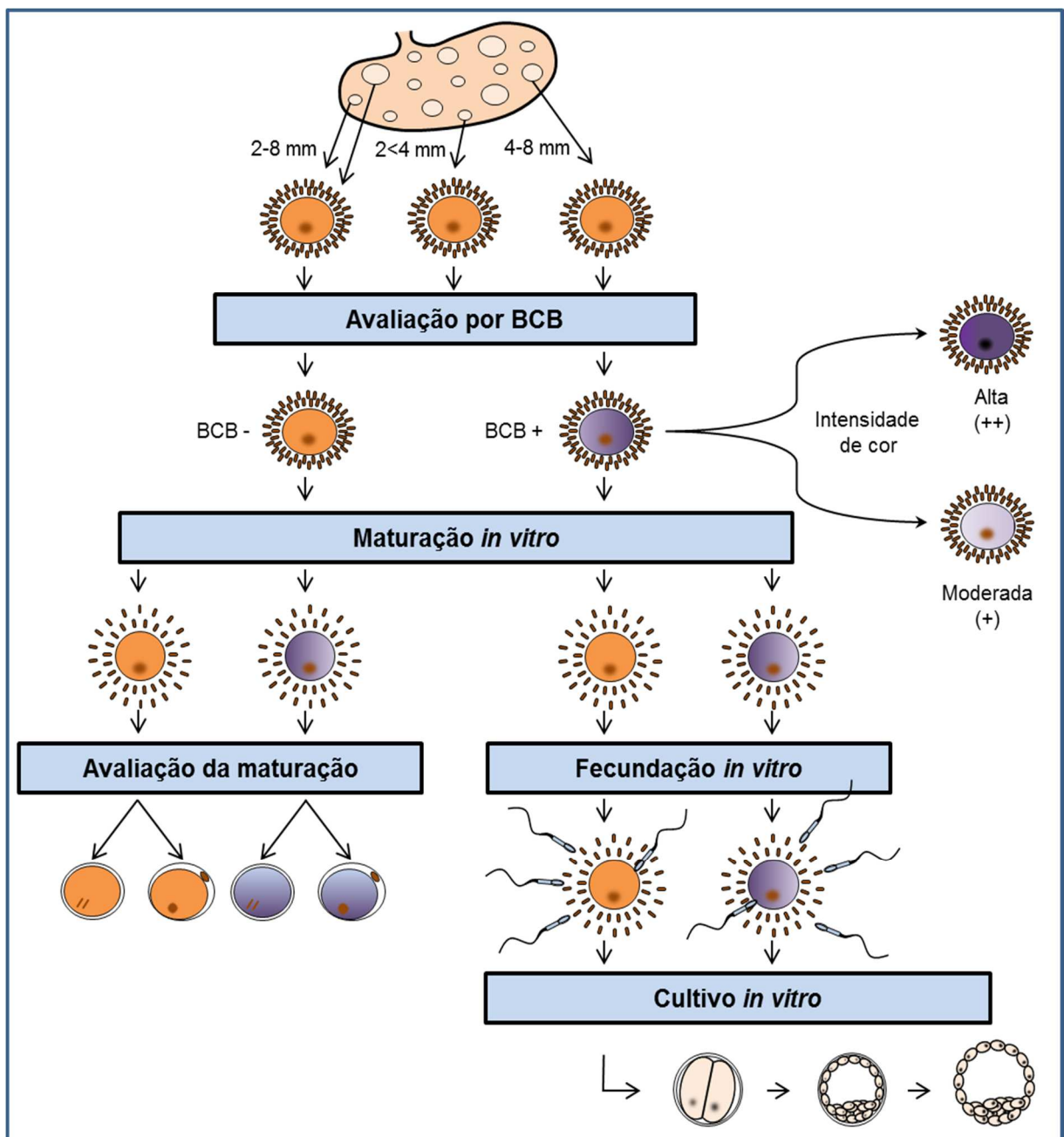


Figura 2 – Diagrama simplificado da avaliação da coloração com BCB, da maturação nuclear e da produção in vitro de embriões.

4.8.1.3 EXPERIMENTO 3 – AVALIAÇÃO DA TAXA DE MATURAÇÃO NUCLEAR

Para avaliação da taxa de maturação nuclear foram utilizados 641 oócitos em três repetições. Os oócitos classificados como BCB+ e BCB- de folículos de diferentes diâmetros foram transferidos para o meio de maturação e cultivados por 22 horas (Figura 2). Um grupo de oócitos (Controle) foi maturado sem ser submetido à coloração por BCB. Ao final da maturação os oócitos foram desnudados, fixados, corados e avaliados quanto à taxa de maturação nuclear.

4.8.1.4 EXPERIMENTO 4 – AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Para realização deste estudo foram utilizados 966 oócitos em quatro repetições. Os oócitos classificados como BCB+ e BCB- de folículos de diferentes diâmetros (item 4.1.) foram maturados, fecundados e cultivados *in vitro* por oito dias (Figura 2). Um grupo de oócitos (Controle) foi avaliado quanto à produção *in vitro* de embriões sem ser submetido à coloração por BCB. No segundo dia do cultivo foi avaliado o percentual de fecundação, no sétimo dia o percentual de blastocistos e no oitavo dia a taxa de eclosão dos blastocistos e seu respectivo número de células (blastômeros).

5. RESULTADOS

5.1. EXPERIMENTO 1

A análise da taxa de coloração com BCB de oócitos provenientes de folículos de diferentes diâmetros estão representadas na Figura 3 e 4.

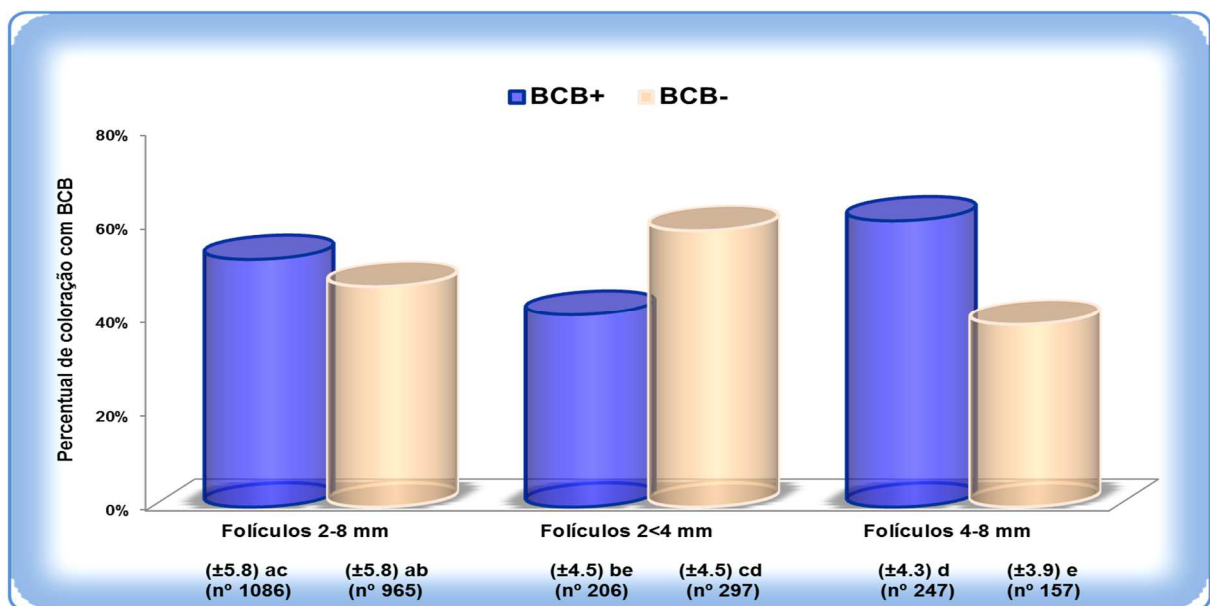


Figura 3 – Avaliação da coloração com BCB em oócitos de folículos de diferentes diâmetros.

5.2 EXPERIMENTO 2

A avaliação da intensidade da coloração de oócitos BCB+ em moderada (+) e alta (++), provenientes de folículos de diferentes diâmetros está representada na Tabela 1 e na Figura 4.

Tabela 1. Variação do percentual de intensidade da coloração de oócitos BCB+

Tratamentos	Oócitos BCB+	Moderada (+)	Alta (++)
	Nº	Nº (% \pm DPM)	Nº (% \pm DPM)
Folículos 2-8 mm	216	110 (51 \pm 3,1) ^a	106 (49 \pm 3,8) ^a
Folículos 2<4 mm	89	54 (61 \pm 3,3) ^b	35 (39 \pm 5,0) ^b
Folículos 4-8 mm	153	57 (37 \pm 2,6) ^c	96 (63 \pm 5,2) ^c

Letras diferentes (a-c) na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Percentual médio (%) mais desvio padrão da média (\pm DPM) de quatro repetições. Coloração azul cresil brilhante (BCB).

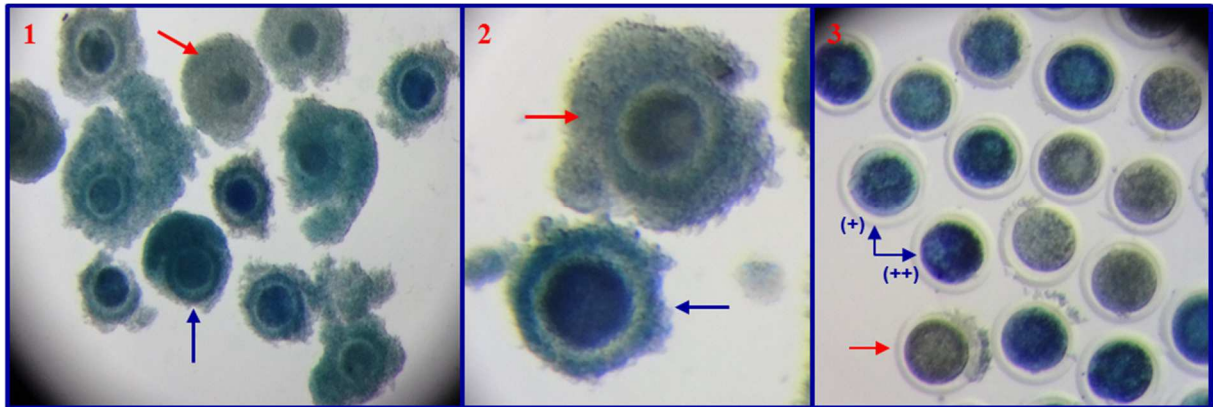


Figura 4 – Imagens de oócitos submetidos à coloração com BCB. Complexo cumulus-oócito (1 e 2) e oócitos desnudos (3). As setas na cor azul indicam oócitos BCB+ e as setas em vermelho indicam oócitos BCB-. Coloração moderada (+) e alta (++) em oócitos BCB+ (3).

5.3. EXPERIMENTO 3

Os resultados do percentual de maturação nuclear de oócitos provenientes de folículos de diferentes diâmetros submetidos à coloração com BCB estão apresentados na Figura 5 e 6.

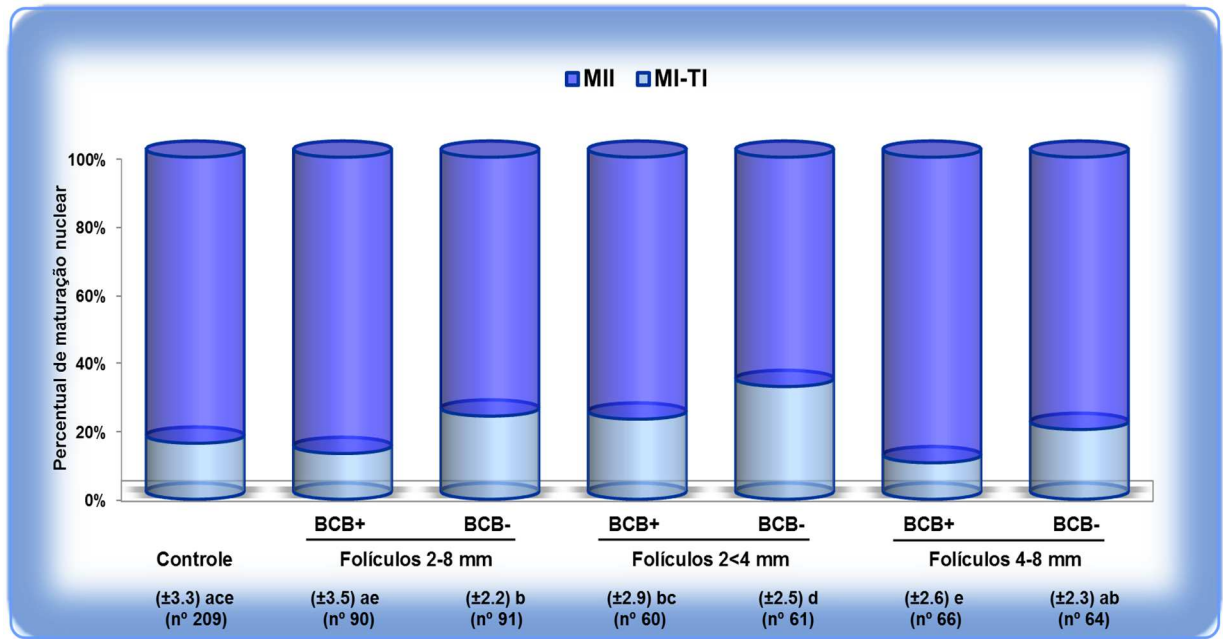


Figura 5 – Avaliação da taxa de maturação nuclear de oócitos provenientes de foliculos de diferentes diâmetros submetidos ao corante BCB. Metáfase I, anáfase I e telófase I (MI-TI) e metáfase II (MII).

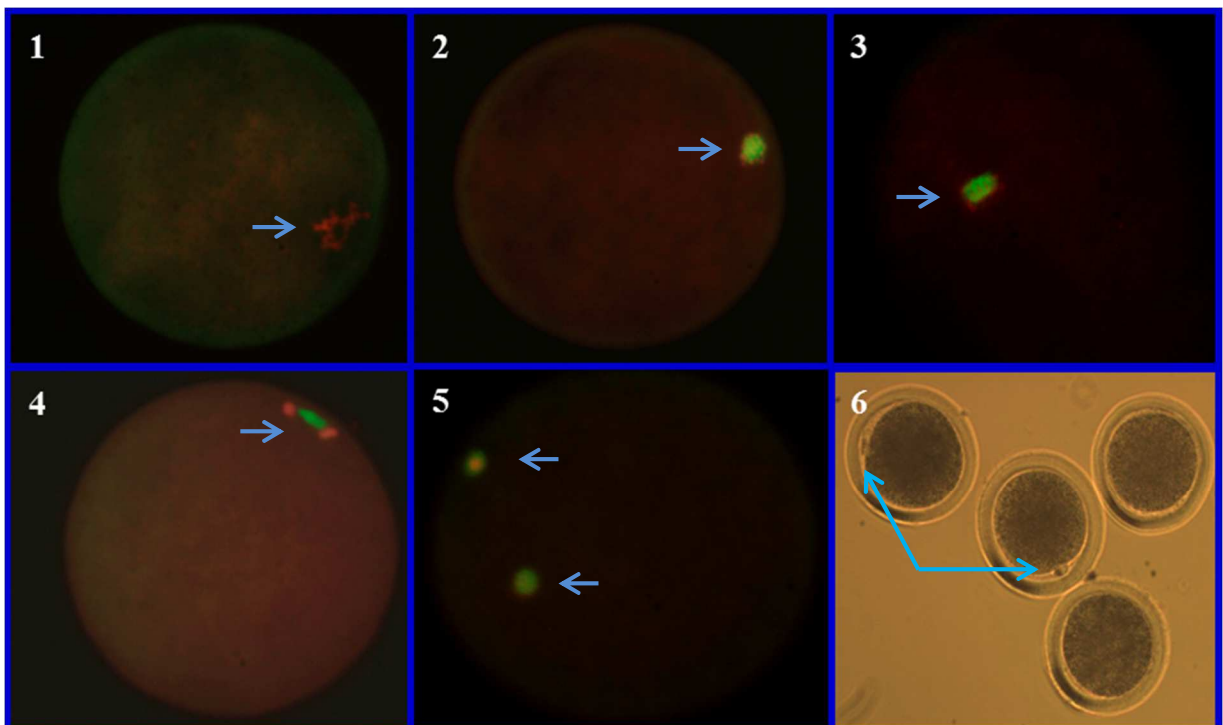


Figura 6 – Imagens de oócitos em estádios de vesícula germinativa (1), metáfase I (2), anáfase I (3), telófase I (4), metáfase II (5) e oócitos com o primeiro corpúsculo polar (6).

5.4. EXPERIMENTO 4

Os resultados da produção *in vitro* de embriões dos oócitos separados em grupos conforme o tamanho dos folículos e de acordo com classificação em BCB+ e BCB- estão apresentados na Tabela 2 e na Figura 7.

Tabela 2. Avaliação da taxa de produção *in vitro* de embriões de oócitos selecionados por BCB de folículos de diferentes diâmetros.

Tratamentos	Oócitos	Clivados D2*	Embriões D7*	Eclodidos D8*	Células D8* ¹	
	Nº	Nº (% ±DPM)	Nº (% ±DPM)	Nº (% ±DPM)	Nº (Mín-Máx±DPM)	
Controle (2-8 mm)	105	83 (79±3.6) ^{ae}	50 (48±5.2) ^a	35 (70±2.7)	188 (115-310±53)	
Folículos 2-8 mm	BCB+	216	186 (86±1.7) ^b	125 (58±3.9) ^b	89 (71±7.4)	196 (100-347±57)
	BCB-	192	146(76±3.1) ^{ac}	76 (40±7.5) ^{cd}	55 (72±6.0)	189 (112-350±61)
Folículos 2<4 mm	BCB+	89	70 (79±1.7) ^{ae}	39 (44±5.3) ^{ac}	27 (69±6.6)	191 (102-345±56)
	BCB-	112	79 (71±4.2) ^c	38 (34±2.2) ^d	26 (68±1.6)	190 (104-300±55)
Folículos 4-8 mm	BCB+	153	141 (92±4.0) ^d	103 (67±3.3) ^e	78 (76±1.4)	199 (102-350±65)
	BCB-	99	80 (81±2.8) ^{be}	53 (54±5.8) ^{ab}	38 (72±1.4)	189 (109-295±50)

Letras diferentes (a-e) na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Percentual médio (%) mais desvio padrão da média (\pm DPM) de quatro repetições. Azul cresil brilhante (BCB). *Dias após fecundação *in vitro* (D). ¹ Número mínimo e máximo (Mín-Máx) de célula dos embriões eclodidos.

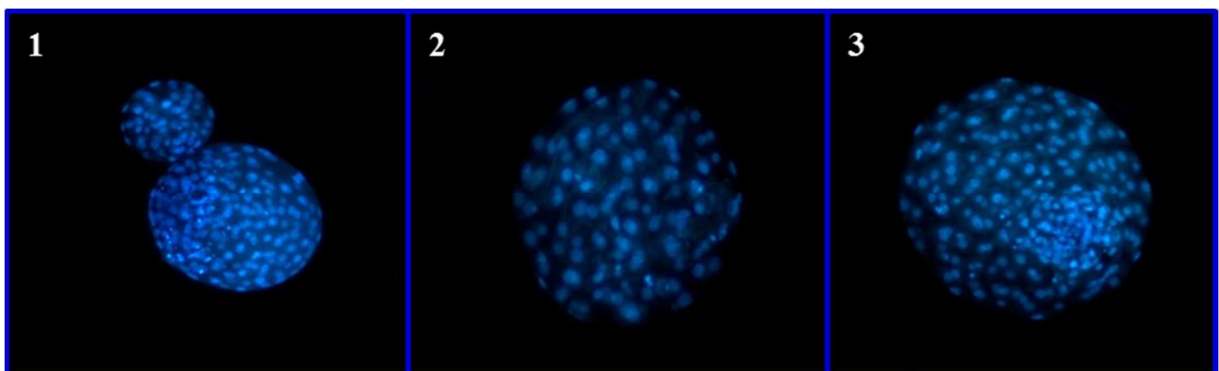


Figura 7 – Imagens de embriões com oito dias pós-fecundação *in vitro*. Embrião em fase de eclosão (1) e embriões com aproximadamente 130 (2) e 270 (3) células.

6. DISCUSSÃO

A seleção de oócitos competentes é imprescindível para o desenvolvimento das técnicas de produção *in vitro* de embriões. Inúmeros estudos têm como base a classificação morfológica dos oócitos usados para produção de embriões, tanto para pesquisa quanto para uso comercial (Alvarez *et al.*, 2009; Melka *et al.*, 2010; De Bem *et al.*, 2014; Guemra *et al.*, 2014). Porém, a seleção dos gametas femininos, baseada nos critérios morfológicos, é influenciada principalmente pela subjetividade da seleção, sendo necessário estabelecer um padrão que atente à universalidade (Dessie *et al.*, 2007). Na tentativa de aperfeiçoar essa prática, o presente estudo demonstrou que a seleção dos oócitos bovinos, baseada nos critérios morfológicos associada à coloração com BCB, proporcionou maior capacidade dos oócitos ao desenvolvimento.

No experimento 1, a avaliação da coloração com BCB, em oócitos provenientes de folículos com 4-8 mm de diâmetros tiveram maior ($p < 0,05$) percentual de oócitos BCB+ (61%) e menor de BCB- (39%) e os oócitos BCB+ desse grupo também foram superiores aos oócitos BCB+ provenientes de folículos com 2<4 (41%) e 2-8 (53%) mm de diâmetros (Figura 3). Esses resultados estão em concordância com outros estudos (Mohammadi-Sangcheshmeh *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012), que propõem que o percentual superior de BCB+ (61%) nos oócitos dos folículos grandes é um indicativo de menor atividade da enzima G6PDH (Rodriguez-González *et al.*, 2002; Alm *et al.*, 2005) em comparação aos oócitos dos folículos pequenos que proporcionaram um maior percentual de oócitos BCB- (59%). De acordo com (Alm *et al.*, 2005; Mohammadi-Sangcheshmeh *et al.*, 2012), a menor atividade da enzima G6PDH nos oócitos BCB+ sugere que os mesmos já concluíram ou estão finalizando sua fase de crescimento.

O maior ($p < 0,05$) percentual de oócitos BCB+ provenientes dos folículos com 4-8 mm de diâmetros em comparação aos folículos com 2<4 mm de diâmetros, segundo alguns estudos, pode estar relacionado com o diâmetro dos oócitos e não com o tamanho dos folículos do qual foram aspirados. Kauffold *et al.* (2005), em seu estudo descreveram que os gametas femininos de bovinos oriundos de folículos menores que 3 mm de diâmetro proporcionam oócitos com tamanho reduzido, enquanto folículos maiores que 3 mm de diâmetro originaram oócitos com

maior volume e, estes, quando aspirados e submetidos a coloração com BCB, apresentaram a coloração azul (BCB+) superior àqueles de folículos menores. Mas (Castaneda *et al.*, 2013), em seu estudo, não considera que os diâmetros dos oócitos seriam um fator preponderante na diferença entre a marcação BCB+ e BCB- dos mesmos. Mas, a provável causa dos percentuais menores de coloração nos oócitos pequenos seria a variabilidade entre os animais abatidos, como: raça, idade ou estado fisiológico.

O percentual de coloração BCB+ ou BCB- de um determinado grupo de oócitos pode estar relacionado com o diâmetro dos oócitos (Kauffold *et al.*, 2005), com a variabilidade entre os animais abatidos (Castaneda *et al.*, 2013) ou com o diâmetro dos folículos, mas o mais provável seria a interação desses fatores, podendo variar para mais ou para menos dependendo de cada estudo. Esses fatores também podem estar relacionados com a intensidade (moderada ou alta) da coloração azulada no citoplasma dos oócitos. Mas, de acordo com os resultados desse estudo, o fator que provavelmente tenha interferido com mais influência na variação da intensidade da coloração dos oócitos BCB+ foi o tamanho dos folículos. Os oócitos BCB+ dos folículos com 4-8 mm diâmetros tiveram um percentual superior ($p < 0,05$) de oócitos com intensidade alta (++) de coloração (Tabela 1), em comparação aos oócitos dos demais tamanhos de folículos (2<4 e 2-8 mm de diâmetros). Quanto maior a porcentagem de oócitos BCB+ com intensidade alta (++), certamente menor será a atividade da enzima G6PDH nos oócitos (Bhojwani *et al.*, 2007; Torner *et al.*, 2008; Mirshamsi *et al.*, 2013), indicando a finalização de seu crescimento (Mirshamsi *et al.*, 2013).

A taxa de maturação nuclear (metáfase II) variou significativamente entre oócitos BCB positivos e negativos independente do tamanho dos folículos (2-8, 2<4 e 4-8 mm de diâmetros). O maior percentual (89%) de metáfase II foi observado nos oócitos BCB+ dos folículos de 4-8 mm de diâmetros e a menor taxa (67%) de metáfase II foi nos oócitos BCB- dos folículos de 2<4 mm de diâmetros. Esses resultados confirmam os achados em outros estudos e em diferentes espécies, bovinos (Pujol *et al.*, 2004; Alm *et al.*, 2005) caprinos (Rodríguez-González *et al.*, 2002) e bubalinos (Manjunatha *et al.*, 2007), que os oócitos BCB+ são mais competentes para completarem a maturação nuclear.

A taxa de maturação nuclear dos oócitos não foi afetada pela exposição ao corante (BCB) de acordo com os resultados (Figura 5) avaliados no

controle (grupo de oócitos não expostos ao corante BCB). Outros estudos em bovinos (Pujol *et al.*, 2004; Alm *et al.*, 2005) também demonstraram uma maior taxa de maturação nuclear nos oócitos corados com BCB sem serem afetados pelo mesmo. Segundo (Alcoba, 2013) e (Silva *et al.*, 2013) os oócitos bovinos BCB+ proporcionaram um aumento significativo na taxa de maturação *in vitro*, que foi caracterizada pela migração dos grânulos corticais para periferia (córtex) e uma maior centralização das mitocôndrias no citoplasma.

A remoção dos gametas femininos de folículos pequenos antes da finalização da capacitação oocitária (Hyttel *et al.*, 1997) é, provavelmente, um dos fatores envolvidos na baixa taxa de maturação *in vitro*, sendo a interrupção da foliculogênese responsável pela redução da competência oocitária (De Bem *et al.*, 2014). O diâmetro dos folículos que provêm os oócitos está relacionado à expansão das células do cumulus e maturação *in vitro* de oócitos bovinos e ovinos segundo (Kauffold *et al.*, 2005) (Han *et al.*, 2006). A competência meiótica (taxa de metáfase II) inferior nos oócitos BCB- pode ser atribuída, em parte, aos seus folículos menores que, por sua vez, podem ser correlacionados com a diferença da atividade da enzima G6PDH (Alm *et al.*, 2005; Mohammadi-Sangcheshmeh *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013) e a influência que ela pode ter na maturação nuclear de oócitos bovinos. Isso, mais uma vez, é apontado para o crescimento incompleto e incapacidade dos oócitos BCB- em levar as etapas da maturação nuclear adiante.

A origem folicular dos oócitos é crucial para determinar a fertilidade, a clivagem e o desenvolvimento dos embriões ao estágio de blastocisto (De Bem *et al.*, 2014), essa competência para o desenvolvimento é adquirida gradualmente e aumenta de acordo com o desenvolvimento folicular (Gandolfi e Gandolfi, 2001). Em bovinos, a competência satisfatória para o desenvolvimento é adquirida quando o folículo atinge um diâmetro de, no mínimo, 3 mm (Gandolfi e Gandolfi, 2001; De Bem *et al.*, 2014). No presente estudo, os oócitos classificados pelo tamanho dos folículos (2<4 e 4-8 mm) influenciaram gradualmente ($p<0,05$) o percentual de clivagem e de blastocisto, independentemente de serem classificados como BCB+ ou BCB- (Tabela 2), mas o percentual de blastocistos eclodidos e o número médio de células dos embriões não diferiram ($p<0,05$) entre os tratamentos. Esses resultados são semelhantes aos relatados por (Algriany *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; De Bem *et al.*, 2014) que afirmam que os folículos maiores têm oócitos mais competentes que os folículos menores e que os oócitos corados com BCB (Catalá *et*

al., 2011; Mirshamsi *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013) têm maior percentual de blastocistos em relação aos oócitos BCB-.

No presente estudo, a principal condição que determinou o desenvolvimento dos oócitos até o estágio de blastocisto baseado nos resultados da Tabela 2 foi o tamanho dos folículos seguidos pela classificação com BCB. O percentual da produção *in vitro* de embriões diferiu ($p < 0,05$) significativamente em relação ao tamanho dos folículos (2<4 e 4-8 mm), sem levar em consideração a coloração com BCB (BCB+ ou BCB-). Os oócitos dos folículos com 4-8 mm de diâmetro proporcionaram aproximadamente 38% mais embriões que os oócitos dos folículos com 2<4 mm diâmetros (Tabela 2). Esses resultados estão de acordo com outros estudos que sugeriram que oócitos de folículos maiores têm maior taxa de produção de embriões em relação aos oócitos de folículos menores (Crozet *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2010; De Bem *et al.*, 2014). Mas, quando a estimativa da produção *in vitro* de embriões foi feita levando em consideração somente a avaliação com BCB, a diferença ($p < 0,05$) foi de aproximadamente 27% em favor dos oócitos BCB+, nesse caso não foi levado em consideração o tamanho dos folículos (2<4 e 4-8 mm). Os resultados apresentados na Tabela 2 estão de acordo com a literatura (Catalá *et al.*, 2011; Mirshamsi *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013) onde oócitos BCB+ são mais aptos para produção *in vitro* de embriões, indicando menor atividade da G6PDH nos oócitos BCB+ e nos oócitos de folículos com 4-8 mm de diâmetros, sinalizando a conclusão de seu crescimento (Rodríguez-González *et al.*, 2002; Pujol *et al.*, 2004; Alm *et al.*, 2005; Manjunatha *et al.*, 2007; Mohammadi-Sangcheshmeh *et al.*, 2012).

Porém, quando a avaliação foi feita entre oócitos de folículos com 2-8 mm de diâmetros (controle) usados por grande número de estudos e também comercialmente (Su *et al.*, 2012) sem serem submetidos à coloração com BCB e confrontados com o grupo de oócitos BCB+ de folículos com 2-8 mm de diâmetros, o acréscimo na produção de embriões foi de aproximadamente 17% para os oócitos BCB+ em relação ao grupo controle (não submetido ao BCB). Esses resultados (Tabela 2) corroboram com a afirmação (Silva *et al.*, 2013) de que o uso da coloração com BCB não interfere negativamente no desenvolvimento da produção de embriões *in vitro*.

A classificação morfológica padrão utilizada em diferentes estudos associada à classificação dos oócitos por BCB traz bons resultados para produção *in vitro* de embriões, de tal maneira que estudos feitos por (Su *et al.*, 2012) relataram

que os oócitos BCB+ utilizados em transferência nuclear de células somáticas (SCNT) tiveram acréscimo na produção *in vitro* de embriões, aumento da viabilidade do percentual de prenhez aos 90 e 180 dias e uma taxa superior de nascimentos em oócitos corados com BCB.

7. CONCLUSÃO

Em suma, os resultados deste estudo confirmam alta correlação entre o diâmetro dos folículos de onde provêm os oócitos com a coloração com BCB.

Oócitos provenientes de folículos com 4-8 mm de diâmetros proporcionam maior percentual de oócitos BCB+ em relação aos demais folículos.

Atestam, ainda, que os resultados da avaliação da competência oocitária com BCB relacionados ou não com o diâmetro dos folículos podem ser utilizados como método eficiente para a seleção de oócitos bovinos junto à avaliação morfológica, sendo que os oócitos BCB+ associados ou não com o diâmetro dos folículos proporcionaram maior percentual de maturação nuclear e de desenvolvimento embrionário aumentando os resultados na produção *in vitro* de embriões.

8. REFERÊNCIAS

- ADONA, P. R.; RIBEIRO–UENF, D.; DOS GOYTACAZES–RJ, C. **Bloqueio da meiose com butirolactona I em ovócitos bovinos: efeitos sobre a maturação nuclear e citoplasmática**. 2006. PhD Thesis, Universidade Estadual Norte Fluminense
- ALCOBA, D. D. Utilização do corante azul cresil brilhante como método de seleção de oócitos humanos destinados à maturação in vitro. 2013.
- ALGRIANY, O. et al. Follicle size-dependent effects of sow follicular fluid on in vitro cumulus expansion, nuclear maturation and blastocyst formation of sow cumulus oocytes complexes. **Theriogenology**, v. 62, n. 8, p. 1483-1497, 2004. ISSN 0093-691X.
- ALM, H. et al. Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Theriogenology**, v. 63, n. 8, p. 2194-2205, 2005. ISSN 0093-691X.
- ALVAREZ, G. M. et al. Immature oocyte quality and maturational competence of porcine cumulus-oocyte complexes subpopulations. **Biocell**, v. 33, n. 3, p. 167-177, 2009. ISSN 0327-9545.
- AYRES, M.; AYRES, D.; SANTOS, A. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil Mamirauá (MCT). 2005.
- BAKRI, N. M. et al. Embryo apoptosis identification: Oocyte grade or cleavage stage? **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 1, p. S50-S55, 2016. ISSN 1319-562X.
- BHOJWANI, S. et al. Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear transfer. **Theriogenology**, v. 67, n. 2, p. 341-345, 2007. ISSN 0093-691X.
- BOLS, P. et al. High throughput non-invasive oocyte quality assessment: the search continues. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 420-25, 2012.
- CAN, A.; SEMIZ, O.; CINAR, O. Centrosome and microtubule dynamics during early stages of meiosis in mouse oocytes. **Molecular human reproduction**, v. 9, n. 12, p. 749-756, 2003. ISSN 1360-9947.
- CASTANEDA, C. A. et al. Lipid content, active mitochondria and brilliant cresyl blue staining in bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 79, n. 3, p. 417-422, 2013. ISSN 0093-691X.
- CATALÁ, M. G. et al. Brilliant Cresyl Blue stain selects largest oocytes with highest mitochondrial activity, maturation-promoting factor activity and embryo developmental

competence in prepubertal sheep. **Reproduction**, v. 142, n. 4, p. 517-527, 2011. ISSN 1470-1626.

COTICCHIO, G. et al. What criteria for the definition of oocyte quality? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1034, n. 1, p. 132-144, 2004. ISSN 1749-6632.

CROZET, N.; AHMED-ALI, M.; DUBOS, M. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. **Journal of reproduction and fertility**, v. 103, n. 2, p. 293-298, 1995. ISSN 1470-1626.

DE BEM, T. et al. The Influence of Morphology, Follicle Size and Bcl-2 and Bax Transcripts on the Developmental Competence of Bovine Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 4, p. 576-583, 2014. ISSN 1439-0531.

DE LOOS, F. et al. Structural aspects of bovine oocyte maturation in vitro. **Molecular reproduction and development**, v. 31, n. 3, p. 208-214, 1992. ISSN 1098-2795.

DESSIE, S.-W. et al. Dielectrophoretic behavior of in vitro-derived bovine metaphase II oocytes and zygotes and its relation to in vitro embryonic developmental competence and mRNA expression pattern. **Reproduction**, v. 133, n. 5, p. 931-946, 2007. ISSN 1470-1626.

DODE, M. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. supl 1, p. 115-130, 2006.

DONNISON, M.; PFEFFER, P. L. Isolation of genes associated with developmentally competent bovine oocytes and quantitation of their levels during development. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 6, p. 1813-1821, 2004. ISSN 0006-3363.

EL SHOURBAGY, S. H. et al. Mitochondria directly influence fertilisation outcome in the pig. **Reproduction**, v. 131, n. 2, p. 233-245, 2006. ISSN 1470-1626.

EPSTEIN, C. J.; WEGIENKA, E. A.; SMITH, C. W. Biochemical development of preimplantation mouse embryos: in vivo activities of fructose 1, 6-diphosphate aldolase, glucose 6-phosphate dehydrogenase, malate dehydrogenase, and lactate dehydrogenase. **Biochemical genetics**, v. 3, n. 3, p. 271-281, 1969. ISSN 0006-2928.

ERICSSON, S. et al. Assessment of porcine oocytes using brilliant cresyl blue. **Theriogenology**, v. 39, n. 1, p. 214, 1993. ISSN 0093-691X.

GANDOLFI, T. B.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1255-1276, 2001. ISSN 0093-691X.

GOOVAERTS, I. et al. Noninvasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte culture. **Theriogenology**, v. 74, n. 9, p. 1509-1520, 2010. ISSN 0093-691X.

GUEMRA, S. et al. Effect of temporary meiosis block during prematuration of bovine cumulus–oocyte complexes on pregnancy rates in a commercial setting for in vitro embryo production. **Theriogenology**, v. 81, n. 7, p. 982-987, 2014. ISSN 0093-691X.

GUEMRA, S. et al. Maturação in vitro de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. 2013. ISSN 0102-0935.

HAN, Z.-B. et al. Interactive effects of granulosa cell apoptosis, follicle size, cumulus–oocyte complex morphology, and cumulus expansion on the developmental competence of goat oocytes: a study using the well-in-drop culture system. **Reproduction**, v. 132, n. 5, p. 749-758, 2006. ISSN 1470-1626.

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. ISSN 0093-691X.

HYTTEL, P. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 23-32, 1997. ISSN 0093-691X.

KAUFFOLD, J. et al. The in vitro developmental competence of oocytes from juvenile calves is related to follicular diameter. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n. 3, p. 325-332, 2005. ISSN 0916-8818.

KIM, J.-W. et al. Ganglioside GD1a promotes oocyte maturation, furthers preimplantation development, and increases blastocyst quality in pigs. **Journal of Reproduction and Development**, n. 0, 2016. ISSN 0916-8818.

KIM, J. et al. Developmental competence of morphologically poor oocytes in relation to follicular size and oocyte diameter in the pig. **Molecular reproduction and development**, v. 77, n. 4, p. 330-339, 2010. ISSN 1098-2795.

LIU, M. The biology and dynamics of mammalian cortical granules. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, n. 1, p. 149, 2011. ISSN 1477-7827.

MANGIA, F.; EPSTEIN, C. J. Biochemical studies of growing mouse oocytes: preparation of oocytes and analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase activities. **Developmental biology**, v. 45, n. 2, p. 211-220, 1975. ISSN 0012-1606.

MANJUNATHA, B. et al. Selection of developmentally competent buffalo oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM. **Theriogenology**, v. 68, n. 9, p. 1299-1304, 2007. ISSN 0093-691X.

MEINECKE, B. et al. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, n. 3-4, p. 183-188, 2001. ISSN 1439-0531.

MELKA, M. et al. Expression of Apoptosis Regulatory Genes and Incidence of Apoptosis in Different Morphological Quality Groups of In Vitro-produced Bovine Pre-implantation Embryos. **Reproduction in domestic animals**, v. 45, n. 5, p. 915-921, 2010. ISSN 1439-0531.

MERTON, J. et al. 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. 80, n. 4, p. 365-371, 2013. ISSN 0093-691X.

MINGOTI, G. Z. et al. The effect of interaction between macromolecule supplement and oxygen tension on bovine oocytes and embryos cultured in vitro. **Zygote**, v. 17, n. 04, p. 321-328, 2009. ISSN 1469-8730.

MIRSHAMSI, S. et al. Combination of oocyte and zygote selection by brilliant cresyl blue (BCB) test enhanced prediction of developmental potential to the blastocyst in cattle. **Animal reproduction science**, v. 136, n. 4, p. 245-251, 2013. ISSN 0378-4320.

MOHAMMADI-SANGCHESHMEH, A. et al. Prediction of oocyte developmental competence in ovine using glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity determined at retrieval time. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 29, n. 2, p. 153-158, 2012. ISSN 1058-0468.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger princípios de bioquímica. **Tradução de Arnaldo Antônio Simões**, 2002.

NEMCOVA, L. et al. Detection of genes associated with developmental competence of bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**, 2016. ISSN 0378-4320.

PARRISH, J. et al. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of reproduction**, v. 38, n. 5, p. 1171-1180, 1988. ISSN 0006-3363.

PONTES, J. et al. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 75, n. 9, p. 1640-1646, 2011. ISSN 0093-691X.

PUJOL, M.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; PARAMIO, M.-T. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. **Theriogenology**, v. 61, n. 4, p. 735-744, 2004. ISSN 0093-691X.

ROCA, J. et al. Selection of immature pig oocytes for homologous in vitro penetration assays with the brilliant cresyl blue test. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 10, n. 6, p. 479-486, 1998. ISSN 1448-5990.

RODRIGUES, B. et al. Preliminary study in immature canine oocytes stained with brilliant cresyl blue and obtained from bitches with low and high progesterone serum profiles. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. s2, p. 255-258, 2009. ISSN 1439-0531.

RODRIGUEZ-GONZÁLEZ, E. et al. Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. **Theriogenology**, v. 57, n. 5, p. 1397-1409, 2002. ISSN 0093-691X.

SHABANKAREH, H. K. et al. In vitro developmental competence of bovine oocytes: Effect of corpus luteum and follicle size. **Iranian journal of reproductive medicine**, v. 13, n. 10, p. 615, 2015.

SILVA, D. et al. Selection of bovine oocytes by brilliant cresyl blue staining: effect on meiosis progression, organelle distribution and embryo development. **Zygote**, v. 21, n. 03, p. 250-255, 2013. ISSN 1469-8730.

SIRARD, M.-A. et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126-136, 2006. ISSN 0093-691X.

SIRARD, M. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1241-1254, 2001. ISSN 0093-691X.

SU, J. et al. Oocytes selected using BCB staining enhance nuclear reprogramming and the in vivo development of SCNT embryos in cattle. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e36181, 2012. ISSN 1932-6203.

TARAZONA, A. et al. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. 1, p. 5-11, 2006. ISSN 1439-0531.

TELFORD, N. A.; WATSON, A. J.; SCHULTZ, G. A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Molecular reproduction and development**, v. 26, n. 1, p. 90-100, 1990. ISSN 1098-2795.

TORNER, H. et al. Molecular and subcellular characterisation of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Reproduction**, v. 135, n. 2, p. 197-212, 2008. ISSN 1470-1626.

TSUTSUMI, O. et al. Determination of enzyme activities of energy metabolism in the maturing rat oocyte. **Molecular reproduction and development**, v. 33, n. 3, p. 333-337, 1992. ISSN 1098-2795.

WANG, L. et al. Selection of ovine oocytes by brilliant cresyl blue staining. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012. ISSN 1110-7243.

WILLIAMS, T. A technique for sexing mouse embryos by a visual colorimetric assay of the X-linked enzyme, glucose 6-phosphate dehydrogenase. **Theriogenology**, v. 25, n. 5, p. 733-739, 1986. ISSN 0093-691X.

WU, Y.-G. et al. Selection of oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining: a study using the mouse model. **Cell Research**, v. 17, n. 8, p. 722-731, 2007. ISSN 1001-0602.

YAMADA, M.; ISAJI, Y. Structural and functional changes linked to, and factors promoting, cytoplasmic maturation in mammalian oocytes. **Reproductive medicine and biology**, v. 10, n. 2, p. 69-79, 2011. ISSN 1445-5781.