



LUIZ MANOEL SOUZA SIMÕES

**CINÉTICA DE MATURAÇÃO NUCLEAR E FECUNDAÇÃO
IN VITRO DE OÓCITOS BOVINOS IMATUROS INJETADOS
EM FOLÍCULO PRÉ OVULATÓRIO**

LAVRAS – MG

2017

LUIZ MANOEL SOUZA SIMÕES

**CINÉTICA DE MATURAÇÃO NUCLEAR E FECUNDAÇÃO *IN VITRO* DE
OÓCITOS BOVINOS IMATUROS INJETADOS EM FOLÍCULO PRÉ
OVULATÓRIO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Reprodução Animal, para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. José Nélio de Sousa Sales
Orientador

Prof. Dr. José Camisão de Souza
Coorientador

LAVRAS – MG

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Simões, Luiz Manoel Souza.

Cinética de maturação nuclear e fecundação *in vitro* de oócitos
bovinos imaturos injetados em folículo pré ovulatório / Luiz
Manoel Souza Simões. - 2017.

47 p. : il.

Orientador(a): José Nélio de Sousa Sales.

.
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Embrião. 2. Intrafolicular. 3. TIFOI. I. Sales, José Nélio de
Sousa. . II. Título.

LUIZ MANOEL SOUZA SIMÕES

**CINÉTICA DE MATURAÇÃO NUCLEAR E FECUNDAÇÃO *IN VITRO* DE
OÓCITOS BOVINOS IMATUROS INJETADOS EM FOLÍCULO PRÉ
OVULATÓRIO**

**NUCLEAR MATURATION KINETICS AND *IN VITRO* FECUNDATION OF
IMMATURE BOVINE OOCYTES INJECTED INTO PREEVULATORY FOLLICLE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Reprodução Animal, para obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 24 de Julho de 2017

Prof. Dr. José Camisão de Souza	UFLA
Profa. Dra. Nadja Gomes Alves	UFLA
Dr. José Felipe Warmling Spricigo	EMBRAPA – CENARGEN

Prof. Dr. José Nélio de Sousa Sales

Orientador

LAVRAS – MG

2017

Àqueles que não mediram esforços para a concretização desse sonho. E que eu jamais conseguirei agradecer e retribuir a confiança a mim depositada. Aos meus queridos pais, Lenira e Manuelito, a quem tanto amo e admiro, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me guiado e protegido durante esses dois anos de mestrado.

A minha mãe, Lenira, por todos os ensinamentos. Se hoje conquisto mais um sonho é porque ela não mediu esforços para me ajudar.

A meu pai, Manuelito, que junto com a minha mãe nunca deixou que nada faltasse durante essa longa trajetória.

A Fernanda, minha namorada e companheira, com quem dividi as angústias e aflições nessa fase de minha vida. Que nunca se importou pelos meses que estive distante. E que sem dúvida sempre me apoiou.

Aos meus irmãos e familiares, por todo amor e carinho.

Aos grandes mestres e doutores com quem tive o prazer de aprender e compartilhar experiências durante esses dois anos. Ao Zé Nélio que, além de orientador tornou-se um grande amigo e acreditou na minha capacidade.

À Universidade Federal de Lavras, pela acolhida. Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e ao Laboratório de Reprodução Animal que, sem dúvida, foi o local onde mais estive durante esses últimos dois anos.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, durante o mestrado.

Aos pós graduandos e graduandos do Laboratório de Reprodução Animal, que me ajudaram na realização dos experimentos.

À EMBRAPA CENARGEN e CNPGL, pelo auxílio nos experimentos. Sem essa ajuda o caminho para chegar até aqui seria mais longo.

Ao Frigorífico Frigominas, por sempre ser prestativo com a doação dos ovários.

Aos meus irmãos e amigos da república Bagaceira por me apoiarem durante os sete anos de convivência.

Às vacas utilizadas nos experimentos, sem elas seria impossível a realização de todo esse sonho.

Às amigadas que construí durante a pós-graduação.

À todos aqueles que me apoiaram e acreditaram na realização desse sonho.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar outros dez.”

George Bernard Shaw

RESUMO GERAL

A produção de embriões bovinos pode ser realizada por biotécnicas *in vivo* e *in vitro*. Na produção *in vivo* utiliza-se a superestimulação ovariana para promover múltiplas ovulações. Com esse intuito, protocolos de superestimulação ovariana foram desenvolvidos. Porém, as vacas doadoras de embriões são submetidas a vários manejos e ao estresse hormonal durante os procedimentos de superovulação e colheita de embriões. Além disso, algumas vacas não respondem aos protocolos de superovulação. Tais dificuldades na produção *in vivo* de embriões não são observadas na produção *in vitro* que consiste em realizar *in vitro* a maturação e fecundação dos oócitos e cultivo inicial do desenvolvimento embrionário. No entanto, embriões produzidos *in vivo* possuem qualidade superior aos produzidos *in vitro*, o que acarreta maior criotolerância e melhores resultados de prenhez. Sendo assim, uma alternativa para melhorar a qualidade embrionária e evitar as dificuldades da produção *in vivo* é a utilização da técnica de injeção intrafolicular de oócitos (IIFO). Porém, a produção de embriões por essa técnica ainda é baixa e variável entre as vacas. Dessa maneira, o objetivo do estudo foi verificar se o processo de maturação *in vivo* de vários oócitos em folículo pré ovulatório está relacionado com a baixa produção de embriões pela técnica de IIFO. Para isso, dois experimentos foram realizados para avaliar a cinética de maturação (Experimento 1) e a fecundação *in vitro* (Experimento 2) de oócitos maturados em folículo pré ovulatório após IIFO. Verificou-se que a maturação de oócitos em folículo pré ovulatório por 20 horas não altera a cinética de maturação e aumenta a capacidade de fecundação *in vitro* em relação aos oócitos que foram maturados *in vitro*. Portanto, a maturação de vários oócitos no folículo pré ovulatório não é o fator determinante para a baixa produção de embriões pela técnica de IIFO.

Palavras-chave: Embrião, Intrafolicular, TIFOI

GENERAL ABSTRACT

The production of bovine embryos can be performed by *in vivo* and *in vitro* biotechniques. In *in vivo* embryo production, ovarian superstimulation is used to promote multiple ovulations. For this purpose, ovarian superstimulation protocols were developed. However, embryo donor cows are subjected to several manipulations and hormonal stress during superovulation and embryo collection procedures. In addition, some cows do not respond to superovulation protocols. Such difficulties in the *in vivo* embryo production are not observed in the *in vitro* technique, that consists in performing, via *in vitro*, the maturation and fecundation of the oocytes and initial culture of the embryonic development. However, embryos produced *in vivo* have superior quality when compared to those produced *in vitro*, which leads to greater cryotolerance and better pregnancy results. Thus, an alternative to improve embryo quality and to avoid the difficulties of *in vivo* production is the use of intrafollicular oocyte injection technique (IFOI). However, the production of embryos by this technique is still low and variable among cows. Thus, the objective of the study was to verify if the process of *in vivo* maturation of several oocytes in pre ovulatory follicle is related to a low production of embryos by the IFOI technique. For this purpose, two experiments were performed to evaluate maturation kinetics (Experiment 1) and *in vitro* fecundation (Experiment 2) of oocytes matured in pre ovulatory follicle after IFOI. It was found that the maturation of oocytes in the pre ovulatory follicle for 20 hours does not alter maturation kinetics and increases *in vitro* fertilization capacity in relation to oocytes that were matured *in vitro*. Therefore, the maturation of several oocytes in the preovulatory follicle is not the determining factor for low embryo production by the IFOI technique.

Keywords: Embryo, Intrafollicular, IFOT.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	10
1 INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO: Produção de embriões bovinos	12
2.1 Produção de embriões <i>in vivo</i>	12
2.2 Produção de embriões <i>in vitro</i>	14
2.3 Particularidades de embriões produzidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	16
2.4 Injeção intrafolicular de oócitos	17
REFERÊNCIAS	19
SEGUNDA PARTE – ARTIGO	25
CINÉTICA DE MATURAÇÃO NUCLEAR E FECUNDAÇÃO <i>in vitro</i> DE OÓCITOS BOVINOS IMATUROS INJETADOS EM FOLÍCULO PRÉ OVULATÓRIO	25

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões vem se desenvolvendo a cada ano, o que aumentou significativamente a utilização da técnica em bovinos. Em 2013, 42% dos embriões produzidos no mundo foram oriundos do processo de fertilização *in vitro* (FIV), sendo 73% produzidos na América do Sul (BLONDIN, 2015). Esse aumento na PIV de embriões ocorreu principalmente pela utilização da aspiração folicular guiada por ultrassonografia, especialmente em países como o Brasil, em que a PIV superou a produção de embriões *in vivo* (PERRY, 2014). O intervalo para produção de embriões de uma doadora é menor com a utilização da aspiração folicular guiada por ultrassonografia, pois as aspirações podem ser realizadas a cada 15 dias sem prejuízos na produção de embriões e para a vaca doadora de oócitos (SALES et al., 2015). Porém, os embriões produzidos *in vitro* possuem menor qualidade (RIZOS et al., 2002b). Embriões produzidos *in vivo* apresentam características ultraestruturais (FAIR et al., 2001), lipídicas (CROSIER et al., 2001), morfológicas (KASSENS et al., 2015) e genéticas (RIZOS et al., 2002a) diferentes de embriões produzidos *in vitro* o que os tornam de melhor qualidade e com melhor resposta ao processo de criopreservação (LONERGAN et al., 2003b). Porém, a produção de embriões *in vivo* possui limitações como o número de manejos nos protocolos de superovulação (BARUSELLI et al., 2006), a necessidade de 30 dias de intervalo entre protocolos de superestimulação para a produção de embriões (BO; MAPLETOFT, 2014) e, 20 a 30% de animais não responderem aos protocolos de superestimulação (BARUSELLI et al., 2010). Dessa maneira, o fator principal que impede a produção dos embriões PIV superar a produção de embriões *in vivo* no cenário mundial é a menor viabilidade, principalmente após o processo de criopreservação (BLONDIN, 2015)

Com o intuito de melhorar a qualidade embrionária, diminuir a quantidade de manejos necessários para produção *in vivo* de embriões e evitar a utilização da produção *in vitro*, uma nova biotecnologia vem sendo desenvolvida e aprimorada. Essa técnica consiste na produção *in vivo* de embriões a partir da transferência intrafolicular de oócitos (KASSENS et al., 2015; SPRICIGO et al., 2016). A técnica de injeção intrafolicular de oócitos (IIFO) foi utilizada pela primeira vez em 1985 em bovinos e bubalinos por laparotomia, gerando o primeiro embrião (FLEMING; SALGADO; KUEHL, 1985). Com o auxílio da ultrassonografia a IIFO se desenvolveu e iniciaram estudos em bovinos (BERGFELT; BROGLIATTI; ADAMS,

1998). Em 2015 e 2017, foi relatado os primeiros nascimentos de bovinos originados da biotecnologia com oócitos maturados (KASSENS et al., 2015) e imaturos (SPRICIGO; DODE, 2016; MICHAEL et al., 2017). Porém, a produção de embriões pela técnica é inferior a PIV (KASSENS et al., 2015; SPRICIGO et al., 2016; MICHAEL et al., 2017). Portanto, é importante investigar as possíveis causas da baixa produção de embriões pela técnica de IIFO, pois é uma técnica promissora para a produção de blastocistos de melhor qualidade com resultados de prenhez consistentes (LONERGAN; FAIR, 2015).

2 REFERENCIAL TEÓRICO: Produção de embriões bovinos

As biotecnologias de produção de embriões são ferramentas utilizadas para aumentar o ganho genético nos rebanhos bovinos e disseminar animais com genética superior (HASLER, 2014). Além do ganho genético, programas de transferência de embriões são aplicados para melhorar o desempenho reprodutivo de vacas *repeat-breeder* (DOCHI et al., 2008) e vacas em estresse térmico (AMBROSE et al., 1999).

2.1 Produção de embriões *in vivo*

Nos programas de produção de embriões *in vivo*, as doadoras de embriões são submetidas ao tratamento de superovulação com a administração de FSH para promover o desenvolvimento dos folículos recrutados na onda folicular que entrariam em atresia após a divergência folicular (BO; MAPLETOFT, 2014). Tradicionalmente, os protocolos consistem em uma administração de gonadotrofina coriônica equina (eCG) ou de duas administrações diárias consecutivas de FSH por quatro dias (MAPLETOFT; STEWARD; ADAMS, 2002). Porém, a maioria dos protocolos de superovulação utiliza o FSH, pois a eCG promove estímulo prolongado no ovário (BO; MAPLETOFT, 2014). Além disso, a eCG altera as concentrações de progesterona e LH nas fêmeas tratadas (JENSEN et al., 1982; GREVE; CALLESEN; HYTTEL, 1983). Tais efeitos reduzem as taxas de fecundação e ovulação (CALLESEN; GREVE; HYTTEL, 1986).

Os tratamentos com gonadotrofinas visando promover a superestimulação folicular devem iniciar na emergência da onda folicular (NASSER et al., 1993). Com esse intuito, os protocolos convencionais de superestimulação ovariana necessitam de observação de estro para determinar o início da onda folicular e, conseqüentemente, o tratamento com gonadotrofinas (BARUSELLI et al., 2006). No entanto, com esse método (observação de cio), a administração de gonadotrofinas pode não coincidir com o dia da emergência de uma nova onda, comprometendo a resposta superestimulatória (NASSER et al., 1993; ADAMS et al., 1994).

A manipulação da emergência de uma nova onda folicular pode ser realizada por métodos mecânicos ou farmacológicos. Dessa forma, métodos como ablação folicular (BERGFELT et al., 1997), utilização de GnRH (KOHARAM et al., 1998; WOCK; LYLE; HOCKETT, 2008; STEEL; HASLER, 2009) ou a associação de estradiol com progesterona

(BO et al., 1995) podem promover a emergência de uma nova onda folicular. Nesses tratamentos, a emergência da onda inicia-se 1-2 dias após a ablação folicular, 1,5-2,5 dias após a administração de GnRH e 4 dias após o início do protocolo com progesterona e estradiol (MAPLETOFT; BO, 2012).

Com o controle do desenvolvimento folicular e o desenvolvimento de protocolos de sincronização da ovulação, a transferência de embriões pode ser realizada sem a necessidade de observação do estro (BARUSELLI et al., 2006). Esses protocolos consistem na administração de FSH quatro dias após a inserção do dispositivo de progesterona (P4) e administração de benzoato de estradiol. A indução sincronizada da ovulação é realizada após a administração de prostaglandinas e remoção do dispositivo de progesterona, com administração de GnRH ou LH. Dentre os protocolos de sincronização da ovulação, o protocolo P36LH48 é o mais indicado para *Bos indicus* (BO; MAPLETOFT, 2014). Nesse protocolo, o dispositivo de progesterona é mantido até 36 horas após a administração de prostaglandina e a ovulação é induzida pela administração de LH 12 horas após a remoção do dispositivo (48 horas após a PGF) (OLIVEIRA et al., 2014). Em *Bos taurus*, o protocolo mais indicado é o P36LH60 que diferente de *Bos indicus*, LH é administrado 60 horas após a PGF (MARTINS et al., 2012). Nesses protocolos as inseminações são realizadas em tempo fixo 12 e 24 após a administração de LH sem a necessidade de detecção de estro (BARROS; NOGUEIRA, 2005; MARTINS et al., 2012). No entanto, pode-se realizar uma única inseminação com sêmen de alta qualidade 16 horas após a administração de LH sem que ocorra comprometimento da fecundação (BARUSELLI et al., 2006). A coleta de embriões é realizada seis dias após a última inseminação em *Bos indicus* e 6,5 dias em *Bos taurus* (BO; MAPLETOFT, 2014).

Os tratamentos para superestimulação normalmente são realizados por administrações consecutivas de FSH durante 4-5 dias (BO; MAPLETOFT, 2014). Porém, o aumento desse período de tratamento para sete dias sem aumento na dose de FSH, melhora a sincronização do crescimento folicular e aumenta as ovulações (GARCIA GUERRA et al., 2012). Por outro lado, o maior número de manejos aumenta a possibilidade de falhas na administração dos hormônios (BO; MAPLETOFT, 2014) e aumenta o estresse nas doadoras provocando redução da resposta superovulatória (BO et al., 1994) e alteração no pico pré-ovulatório de LH (STOEBEL; MOBERG, 1982). Na literatura, os trabalhos têm demonstrado que uma a quatro administrações de FSH apresentaram resultados similares aos protocolos com oito administrações. Para isso, modificaram para a via de administração subcutânea (BO et al., 1994) ou utilizaram solução à base de ácido hialurônico (TRIBULO et al., 2011; TRIBULO et

al., 2012) ou de gel de hidróxido de alumínio (KIMURA, 2016). Porém, animais com menor deposição de tecido adiposo podem não responder ao protocolo com uma única administração de FSH subcutânea (BO et al., 1994). A diluição de FSH em 2% de solução a base de ácido hialurônico é trabalhosa (TRIBULO et al., 2011) e o uso de preparações com gel de hidróxido de alumínio apresenta reações no local da administração (KIMURA, 2016).

Com o intuito de fornecer estímulo constante aos receptores foliculares de LH na fase final de desenvolvimento folicular substitui-se as duas últimas aplicações de FSH pela eCG (OLIVEIRA et al., 2014), visto que a eCG possui afinidade para receptores de FSH/LH (MURPHY; MARTINUK, 1991). Desta forma, a substituição de FSH pela eCG nas últimas duas administrações aumenta o número de embriões viáveis após a coleta de embriões (BARROS et al., 2008; MATTOS et al., 2011). No entanto, Sartori et al. (2009), Davis; Artega e Hasler (2012) e Oliveira et al. (2014) não observaram efeito no número de embriões viáveis quando se fez a substituição das últimas doses de FSH pela eCG.

A produção de embriões *in vivo* é influenciada pelo número de folículos presentes no ovário no momento do tratamento com gonadotrofinas (MONNIAUX et al., 2012) em que, animais com maior número de folículos ovarianos apresentam melhores respostas aos protocolos de superovulação (SINGH et al., 2004; IRELAND et al., 2007; SILVA-SANTOS et al., 2014). Mais recentemente, verificou-se correlação entre o número de folículos visualizados e a concentração de AMH (MONNIAUX et al., 2012) e entre a concentração de AMH e a resposta superovulatória (RICO et al., 2012).

Mesmos com avanços nos protocolos de superovulação, o número médio de embriões não se alterou durante os últimos anos como demonstrado pela Associação Americana de Transferência de Embriões (AETA). A produção média em doadoras de corte foi de sete embriões e em doadoras holandesas 6,3 embriões (HASLER, 2014). Na década de 80 a produção média de embriões em vacas de corte era de 6,2 embriões/vaca (LOONEY, 1986) e de 6,4 para vacas holandesas (HASLET et al., 1983).

2.2 Produção de embriões *in vitro*

A produção *in vitro* de embriões é dividida em três etapas: maturação oocitária (MIV), fertilização (FIV) e cultivo do zigoto até blastocisto (CIV). Normalmente, os oócitos são recuperados de animais por aspiração folicular guiada por ultrassonografia transvaginal e então passam pelas etapas de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* (LONERGAN; FAIR, 2015). Na maturação *in vitro*, os oócitos são incubados em meio de cultivo celular (TCM199)

com sais de EARLE's (DODE; RUMPF, 2002), suplementado com fontes energéticas (glicose, piruvato), proteicas [soro fetal bovino e albumina sérica bovina; (ALI; SIRARD, 2002)] e com hormônios LH ou FSH (HEINZMANN et al., 2015) por um tempo de 18 a 24 horas (KOYAMA et al., 2014). Esse ambiente permite que ocorra a maturação nuclear e reorganização citoplasmática. Esse período de maturação resulta em melhor produção de blastocistos *in vitro* (WARD et al., 2002). Em termos de eficiência, aproximadamente 90% dos oócitos imaturos completam a maturação nuclear *in vitro* (LONERGAN et al., 2003b). O ambiente de maturação oocitária e o tamanho do folículo no qual o oócito foi adquirido influenciam as taxas de produção de blastocistos, pois oócitos maturados *in vivo* e de folículos maiores que 6mm maturados *in vitro* apresentaram maior taxa de blastocistos (RIZOS et al., 2002b).

Assim como o ambiente de maturação influencia a produção de blastocistos na PIVE, o ambiente no qual ocorre a fecundação também interfere nas taxas de blastocistos. Embriões maturados e fertilizados *in vivo* apresentaram maior taxa de blastocisto do que os produzidos *in vitro* (RIZOS et al., 2002b). Na PIVE, os espermatozoides são submetidos a métodos de seleção espermática, com o objetivo de remover o plasma seminal e crioprotetores para aumentar as características de qualidade espermática. Os métodos mais utilizados são o *swim-up* e a centrifugação com gradiente de Percoll (RODRIGUEZ-MARTINEZ; LARSSON; PERTOFT, 1997). Ambos os métodos são eficientes para a produção de embriões *in vitro*. Após a seleção espermática, os espermatozoides são incubados de 12 a 18 horas com os oócitos (DODE et al., 2002), com concentração espermática variando de $1,0 \times 10^6$ spz/ml (DEMYDA-PEYRAS et al., 2015) até $4,0 \times 10^6$ spz/ml (CAMARGO et al., 2000). Variações na concentração de espermatozoides ocorrem principalmente por diferenças existentes entre indivíduos e raças (BRACKETT; KESKINTEPE, 1996). No entanto, alta concentração espermática aumenta a incidência de embriões poliploides (DEMYDA-PEYRAS et al., 2015).

Após a fecundação, os zigotos são transferidos para meios de cultivo no qual permanecem por sete dias até se desenvolverem a blastocistos. Nessa fase de desenvolvimento, os embriões estão aptos para serem criopreservados ou transferidos para as receptoras. Esse período é determinante para a qualidade embrionária, pois pode afetar a ultraestrutura, o metabolismo e a expressão gênica (RIZOS et al., 2002a). Com o objetivo de mimetizar um ambiente *in vivo*, os meios de cultivo podem ser compostos por soro fetal bovino (SFB) e/ou albumina sérica bovina (BSA), que são proteínas derivadas de animais. Porém, embriões produzidos em meios contendo SFB apresentam maior conteúdo lipídico,

tornando-os menos tolerantes à criopreservação (MORENO et al., 2015). Devido aos problemas de utilização de proteínas de origem animal e a competição de células somáticas com os embriões, meios sintéticos vem sendo desenvolvidos sem adição de BSA e SFB (WRENZYCKI et al., 2001; LONERGAN et al., 2004; MORENO et al., 2015) e de células somáticas. A ausência de células somáticas no meio de cultivo é importante, pois essas células competem com o embrião após o quarto dia de cultivo (GONÇALVES et al., 2002). Além disso, as fontes proteicas provenientes de material biológico não possuem padronização e apresentam alta variação (ALI; SIRARD, 2002). No entanto, células em co-cultivo podem retirar embriotoxinas do meio de cultivo e produzir substâncias embriotróficas que auxiliam o embrião (RIEF et al., 2002).

2.3 Particularidades de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*

Embriões produzidos *in vitro* apresentam algumas diferenças na morfologia e ultraestrutura celular, na resistência a baixas temperaturas e na expressão gênica que interferem na qualidade do embrião quando comparados a embriões produzidos *in vivo* (LAZZARI et al., 2002). Tais mudanças observadas no embrião *in vitro* ocorrem durante o processo de maturação (ADONA et al., 2016), fertilização (RIZOS et al., 2002b) e cultivo *in vitro* (RIZOS et al., 2002b; LONERGAN et al., 2003a; LONERGAN et al., 2004).

A competência oocitária é influenciada pelo processo de maturação *in vitro*, pois altera a expressão de genes relacionados ao metabolismo do oócito (ADONA et al., 2016) e reduz a taxa de produção de blastocistos (RIZOS et al., 2002b). A qualidade embrionária é inferior em embriões cultivados *in vitro* (CROSIER et al., 2001; FAIR et al., 2001), principalmente embriões cultivados *in vitro* em meio contendo soro fetal bovino (CROSIER et al., 2001; ABE et al., 2002). Estudos demonstraram que blastocistos produzidos *in vivo* possuem espaço perivitelino menor, maior número de microvilosidades na membrana plasmática, maior quantidade de junções intercelulares, maior quantidade de mitocôndrias maduras (FAIR et al., 2001), menor densidade lipídica (CROSIER et al., 2001) e citoplasma mais claro (KASSENS et al., 2015). Tais características embrionárias conferem aos embriões produzidos *in vivo* melhor resposta ao processo de criopreservação. Além disso, o meio de cultivo *in vitro*, principalmente contendo soro fetal bovino, aumenta o acúmulo lipídico no citoplasma dos blastocistos, o que reduz a congelabilidade dos embriões, possivelmente pela incorporação de lipídios do soro incluso no meio de cultivo nas células embrionárias (ABE et al., 2002). A PIVE, além de ocasionar mudanças estruturais nos blastocistos, também afeta o padrão de

expressão gênica no embrião (RIZOS et al., 2002a) e no oócito (ADONA et al., 2016). A maioria dos produtos dos genes que são alterados no período pós-fertilização estão envolvidos em processos biológicos como metabolismo, adaptação ao estresse, transcrição e tradução, regulação epigenética de transcrição, apoptose e formação de blastocistos (CORCORAN et al., 2006). Assim, Gutierrez-Adan et al. (2004) verificaram que na produção *in vitro* de embriões houve aumento de genes relacionados à resposta ao estresse e diminuição em genes relacionados ao metabolismo celular. Da mesma forma, em suínos, verificou-se que blastocistos produzidos *in vivo* apresentavam maior quantidade relativa de genes ligados ao estabelecimento e manutenção da pluripotência (KUMAR et al., 2007; MAGNANI; CABOT, 2008). Portanto, condições de cultivo *in vitro* ocasionam modificações na expressão de genes do embrião, além de alterar a parte ultraestrutural e a capacidade de suportar métodos de criopreservação (LAZZARI et al., 2002; RIZOS et al., 2002a; RIZOS et al., 2002b).

2.4 Injeção intrafolicular de oócitos

A transferência intrafolicular de oócitos é uma técnica que consiste na injeção de oócitos dentro de um folículo pré-ovulatório, com o propósito de fornecer as condições *in vivo* (SPRICIGO et al., 2016) para o desenvolvimento desse oócito até a fase de embrião. Com a utilização da ultrassonografia transvaginal, a técnica vem sendo melhorada e utilizada em éguas (GOUDET et al., 1997; DELEUZE et al., 2009), vacas (BERGFELT; BROGLIATTI; ADAMS, 1998; SPRICIGO et al., 2016; MICHAEL et al., 2017) e em humanos (WERNER-VON DER BURG; COORDES; HATZMANN, 1993).

Bergfelt; Brogliatti e Adams (1998) verificaram que a punção do folículo dominante com agulha de 25G não interfere na capacidade ovulatória do folículo puncionado e que é possível a obtenção de embriões extras quando se faz IIFO com o auxílio da ultrassonografia transvaginal. Recentemente foram relatados os primeiros nascimentos de bezerros oriundos da técnica de IIFO utilizando oócitos maturados *in vitro* (KASSENS et al., 2015) e de oócitos imaturos (MICHAEL et al., 2017). Além disso, foi verificado que bezerros de IIFO são mais leves que oriundos de PIVE, e que os embriões apresentam menor acúmulo de gotas lipídicas, maior tolerância à criopreservação e maior taxa de prenhez que embriões produzidos em meio contendo soro de vaca em estro (KASSENS et al., 2015). No entanto, a técnica de injeção de oócitos no folículo dominante deve ser aprimorada (LONERGAN; FAIR, 2015), pois a produção de embriões é variável entre indivíduos e baixa quando comparada com o processo de produção *in vitro* de embriões (KASSENS et al., 2015; SPRICIGO et al., 2016; MICHAEL

et al., 2017). Contudo, é uma técnica que pode fornecer melhoras na qualidade embrionária (KASSENS et al., 2015), pois embriões cultivados *in vivo* apresentam melhor qualidade do que aqueles cultivados *in vitro* permitindo criopreservação (RIZOS et al., 2002a; RIZOS et al., 2002b).

REFERÊNCIAS

- ABE, H. et al. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Mol Reprod Dev**, v.61, p.57-66, 2002.
- ADAMS, G. P. et al. Superovulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. **Theriogenology**, v.42, p.1103-13, 1994.
- ADONA, P. R. et al. In vitro maturation alters gene expression in bovine oocytes. **Zygote**, v.24, p.624-33, 2016.
- ALI, A.; SIRARD, M. A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. **Biol Reprod**, v.66, p.901-5, 2002.
- AMBROSE, J. D. et al. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen in vitro produced embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed dairy cattle. **J Dairy Sci**, v.82, p.2369-76, 1999.
- BARROS, C. M. et al. Improvement of a superovulatory protocol in Nelore cows: replacing the last two doses of pFSH by eCG. **Reprod Fertil Dev**, v.20, p.152, 2008.
- BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. G. Superovulation in zebu cattle: Protocol P-36. **Embryo Transf Newsl**, v.23, p.5-9, 2005.
- BARUSELLI, P. S. et al. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v.65, p.77-88, 2006.
- BARUSELLI, P. S. et al. Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. **Reprod Fertil Dev**, v.22, p.67-74, 2010.
- BERGFELT, D. R. et al. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle. **Anim Reprod Sci**, v.49, p.1-12, 1997.
- BERGFELT, D. R.; BROGLIATTI, G. M.; ADAMS, G. P. Gamete recovery and follicular transfer (graft) using transvaginal ultrasonography in cattle. **Theriogenology**, v.50, p.15-25, 1998.
- BLONDIN, P. Status of embryo production in the world. **Anim Reprod**, v.12, p.356-358, 2015.
- BO, G. A. et al. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Anim Reprod Sci**, v.39, p.193-204, 1995.
- BO, G. A. et al. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Folltropin-V in beef cattle. **Theriogenology**, v.42, p.963-75, 1994.

BO, G. A.; MAPLETOFT, R. J. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. **Theriogenology**, v.81, p.38-48, 2014.

BRACKETT, B. G.; KESKINTEPE, L. Defined sperm treatments and insemination conditions enable improved bovine embryo production in vitro. **Theriogenology**, v.45, p.259, 1996.

CALLESEN, H.; GREVE, T.; HYTTEL, P. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. **Theriogenology**, v.25, p.71-86, 1986.

CAMARGO, L. S. A. et al. Concentração espermática na fecundação in vitro, com sêmen de touro da raça Guzerá. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.52, p.59-64, 2000.

CORCORAN, D. et al. Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in in vitro compared with in vivo cultured bovine embryos. **Reproduction**, v.131, p.651-60, 2006.

CROSIER, A. E. et al. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. **Biol Reprod**, v.64, p.1375-85, 2001.

DAVIS, R. L.; ARTEGA, A.; HASLER, J. F. Addition of equine chorionic gonadotropin to a traditional follicle stimulating hormone protocol for superovulation of *Bos taurus* beef cows. **Reprod Fertil Dev**, v.24, p.224-225, 2012.

DELEUZE, S. et al. Efficiency of embryonic development after intrafollicular and intraoviductal transfer of in vitro and in vivo matured horse oocytes. **Theriogenology**, v.72, p.203-9, 2009.

DEMYDA-PEYRAS, S. et al. Influence of sperm fertilising concentration, sperm selection method and sperm capacitation procedure on the incidence of numerical chromosomal abnormalities in IVF early bovine embryos. **Reprod Fertil Dev**, v.27, p.351-9, 2015.

DOCHI, O. et al. The use of embryo transfer to produce pregnancies in repeat-breeding dairy cattle. **Theriogenology**, v.69, p.124-8, 2008.

DODE, M. A. et al. The effect of sperm preparation and co-incubation time on in vitro fertilization of *Bos indicus* oocytes. **Anim Reprod Sci**, v.69, p.15-23, 2002.

DODE, M. A.; RUMPF, R. Produção *in vitro* de embriões na espécie bovina. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento** v.26, p.32-37, 2002.

FAIR, T. et al. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. **Mol Reprod Dev**, v.58, p.186-95, 2001.

FLEMING, A. D.; SALGADO, R.; KUEHL, T. J. Maturation of baboon or cow oocytes transplanted into a surrogate dominant follicle *in vivo*. **Theriogenology**, v.23, p.193, 1985.

GARCIA GUERRA, A. et al. Lengthening the superstimulatory treatment protocol increases ovarian response and number of transferable embryos in beef cows. **Theriogenology**, v.78, p.353-60, 2012.

GONÇALVES, P. et al. Produção de embriões *in vitro*. In: GONÇALVES, P.; FIGUEIREDO, J. D.; FREITAS, V. D. **Biotécnicas aplicadas a reprodução animal**. São Paulo: Ed. Varela, p. 195-226, 2002.

GOUDET, G. et al. Transfer of immature oocytes to a preovulatory follicle: an alternative to *in vitro* maturation in the mare? **Equine Vet J Suppl**, p.54-9, 1997.

GREVE, T.; CALLESEN, H.; HYTTEL, P. Endocrine profiles and egg quality in the superovulated cow. **Nord Vet Med**, v.35, p.408-21, 1983.

GUTIERREZ-ADAN, A. et al. Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured *in vivo* or *in vitro*. **Mol Reprod Dev**, v.68, p.441-8, 2004.

HASLER, J. F. Forty years of embryo transfer in cattle: a review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. **Theriogenology**, v.81, p.152-69, 2014.

HASLER, J. F. et al. Superovulatory responses of Holstein cows. **Theriogenology**, v.19, p.83-99, 1983.

HEINZMANN, J. et al. Extended *in vitro* maturation affects gene expression and DNA methylation in bovine oocytes. **Mol Hum Reprod**, v.21, p.770-82, 2015.

IRELAND, J. J. et al. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Hum Reprod**, v.22, p.1687-95, 2007.

JENSEN, A. M. et al. Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG-PGF2alpha treated cow. **Theriogenology**, v.18, p.33-44, 1982.

KASSENS, A. et al. Intrafollicular Oocyte Transfer (IFOT) of Abattoir-Derived and *In Vitro*-Matured Oocytes Results in Viable Blastocysts and Birth of Healthy Calves. **Biol Reprod**, v.92, 1-14, 2015.

KIMURA, K. Superovulation with a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel: a novel superovulation method for cattle. **J Reprod Dev**, v.62, p.423-429, 2016.

KOHRAM, H. et al. Ovarian superstimulation after follicular wave synchronization with GnRH at two different stages of the estrous cycle in cattle. **Theriogenology**, v.49, p.1175-86, 1998.

KOYAMA, K. et al. Estimation of the optimal timing of fertilization for embryo development of *in vitro*-matured bovine oocytes based on the times of nuclear maturation and sperm penetration. **J Vet Med Sci**, v.76, p.653-9, 2014.

KUMAR, B. M. et al. Differential gene expression patterns in porcine nuclear transfer embryos reconstructed with fetal fibroblasts and mesenchymal stem cells. **Dev Dyn**, v.236, p.435-46, 2007.

- LAZZARI, G. et al. Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. **Biol Reprod**, v.67, p.767-75, 2002.
- LONERGAN, P.; FAIR, T. Maturation of Oocytes in Vitro. **Annu Rev Anim Biosci**, v.4, p.255-68, 2015.
- LONERGAN, P. et al. Effect of the post-fertilization culture environment on the incidence of chromosome aberrations in bovine blastocysts. **Biol Reprod**, v.71, p.1096-100, 2004.
- LONERGAN, P. et al. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reprod Domest Anim**, v.38, p.259-67, 2003a.
- LONERGAN, P. et al. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. **Biol Reprod**, v.69, p.1424-31, 2003b.
- LOONEY, C. R. Superovulation in beef females. In: Proceedings of the 5th Annual Convention of the AETA. **AETS**, p.16-32, 1986.
- MAGNANI, L.; CABOT, R. A. In vitro and in vivo derived porcine embryos possess similar, but not identical, patterns of Oct4, Nanog, and Sox2 mRNA expression during cleavage development. **Mol Reprod Dev**, v.75, p.1726-35, 2008.
- MAPLETOFT, R. J.; BO, G. A. The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. **Reprod Fertil Dev**, v.24, p.278-83, 2012.
- MAPLETOFT, R. J.; STEWARD, K. B.; ADAMS, G. P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reprod Nutr Dev**, v.42, p.601-11, 2002.
- MARTINS, C. M. et al. The effect of timing of the induction of ovulation on embryo production in superstimulated lactating Holstein cows undergoing fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v.78, p.974-80, 2012.
- MATTOS, M. C. et al. Improvement of embryo production by the replacement of the last two doses of porcine follicle-stimulating hormone with equine chorionic gonadotropin in Sindhi donors. **Anim Reprod Sci**, v.125, p.119-23, 2011.
- MICHAEL, H. et al. Birth of healthy calves after intra-follicular transfer (IFOT) of slaughterhouse derived immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v.97, p.41-49, 2017.
- MONNIAUX, D. et al. Regulation of anti-Mullerian hormone production in domestic animals. **Reprod Fertil Dev**, v.25, p.1-16, 2012.
- MORENO, D. et al. In vitro bovine embryo production in a synthetic medium: embryo development, cryosurvival, and establishment of pregnancy. **Theriogenology**, v.84, p.1053-60, 2015.
- MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine chorionic gonadotropin. **Endocr Rev**, v.12, p.27-44, 1991.

- NASSER, L. F. et al. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. **Theriogenology**, v.40, p.713-24, 1993.
- NEMCOVA, L. et al. Detection of genes associated with developmental competence of bovine oocytes. **Anim Reprod Sci**, v.166, p.58-71, 2016.
- OLIVEIRA, A. C. et al. Efficiency of superstimulatory protocol P-36 associated with the administration of eCG and LH in Nelore cows. **Theriogenology**, v.82, p.715-9, 2014.
- PERRY, G. 2013 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. **Embryo Transf. Newsl**, v.32, p.14-36, 2014.
- RICO, C. et al. Determination of anti-Mullerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm. **Reprod Fertil Dev**, v.24, p.932-44, 2012.
- RIEF, S. et al. Effects of a novel co-culture system on development, metabolism and gene expression of bovine embryos produced in vitro. **Reproduction**, v.124, p.543-56, 2002.
- RIZOS, D. et al. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. **Biol Reprod**, v.66, p.589-95, 2002a.
- RIZOS, D. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Mol Reprod Dev**, v.61, p.234-48, 2002b.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B.; PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. **Reprod Fertil Dev**, v.9, p.297-308, 1997.
- SALES, J. N. et al. Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. **J Dairy Sci**, v.98, p.3086-99, 2015.
- SARTORI, R. et al. Lack of improvement on embryo production by the replacement of the last two doses of pFSH by eCG in superovulated Nelore heifers. **Reprod Fertil Dev**, v.21, p.245-246, 2009.
- SILVA-SANTOS, K. C. et al. Antral follicle populations and embryo production--in vitro and in vivo--of *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages. **Reprod Domest Anim**, v.49, p.228-32, 2014.
- SINGH, J. et al. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. **Theriogenology**, v.62, p.227-43, 2004.
- SPRICIGO, J. F. et al. Intrafollicular transfer of fresh and vitrified immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v.86, p.2054-62, 2016.
- STEEL, R. G.; HASLER, J. F. Comparison of three different protocols for superstimulation of dairy cattle. **Reprod Fertil Dev**, v.21, p.246, 2009.

STOEBEL, D. P.; MOBERG, G. P. Repeated acute stress during the follicular phase and luteinizing hormone surge of dairy heifers. **J Dairy Sci**, v.65, p.92-6, 1982.

TRIBULO, A. et al. Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. **Anim Reprod Sci**, v.129, p.7-13, 2011.

TRIBULO, A. et al. Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two concentrations of hyaluronan. **Theriogenology**, v.77, p.1679-85, 2012.

WARD, F. et al. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. **Theriogenology**, v.57, p.2105-17, 2002.

WERNER-VON DER BURG, W.; COORDES, I.; HATZMANN, W. Pregnancy following intrafollicular gamete transfer. **Hum Reprod**, v.8, p.771-4, 1993.

WOCK, J. M.; LYLE, L. M.; HOCKETT, M. E. Effect of gonadotropin-releasing hormone compared with estradiol-17b at the beginning of a superstimulation protocol on superovulatory response and embryo quality. **Reprod Fertil Dev**, v.20, p.228-229, 2008.

WRENZYCKI, C. et al. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. **Hum Reprod**, v.16, p.893-901, 2001.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO**CINÉTICA DE MATURAÇÃO NUCLEAR E FECUNDAÇÃO *in vitro* DE OÓCITOS
BOVINOS IMATUROS INJETADOS EM FOLÍCULO PRÉ OVULATÓRIO**

Simões, LMS¹; Santos, APC¹; Bottino, MP¹; Rodrigues, SAD²; Rodrigues Jr, MM³; Pontes, TT¹; Quintão, CCR⁴; Camargo, LSA⁴; Sales, JNS¹.

¹Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

²Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil

³MS Reprodução, Campo Grande, MS, Brasil

⁴EMBRAPA-Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil

RESUMO

O objetivo foi avaliar a cinética de maturação e a fecundação *in vitro* de oócitos bovinos imaturos injetados em folículo pré ovulatório de vacas previamente sincronizadas pela técnica de injeção intrafolicular de oócitos (IIFO). No experimento 1, complexos *cumulus* oócitos (CCOs; n=438) de graus I, II e III foram blocados por qualidade e distribuídos aleatoriamente em um de três grupos: Matvitro (n=111), CCOs maturados *in vitro* por 22 h; Matvivo20 (n=172) e Matvivo30 (n=155), 30 oócitos imaturos foram injetados em cada folículo pré ovulatório de vacas receptoras de oócitos previamente sincronizadas. No Matvivo20, oócitos foram maturados por $19,8 \pm 0,1$ h e no Matvivo30, por $28,3 \pm 0,1$ h. As vacas receberam 12,5 mg de LH (Lutropin, Bioniche, Canada) na IIFO (Matvivo20) ou 10 h após a IIFO (Matvivo30). Oócitos do Matvivo20 e Matvivo30 foram aspirados 20 h depois da injeção de LH para avaliação da maturação nuclear e taxa de recuperação. Oócitos foram avaliados de acordo com a cinética de maturação em: vesícula germinativa, metáfase I, anáfase I, teláfase I, metáfase II, ativados partenogeneticamente e degenerados (aberrações cromossômicas e presença de cromatina difusa ou indefinida). No experimento 2, CCOs imaturos de ovários de abatedouro (n=202) de grau I,II e III foram blocados por qualidade e distribuídos aleatoriamente em dois grupos: Matvitro (n=103), CCOs foram maturados e fertilizados *in vitro*; Matvivo (n=99), mesmo delineamento utilizado no grupo Matvivo20, e os CCOs foram fertilizados *in vitro*. Futuros zigotos foram classificados como fertilizados, não fertilizados ou poliespérmicos. Análise estatística foi realizada pelo procedimento GLIMMIX do SAS. Taxa de recuperação foi menor ($p < 0,001$) em Matvivo20 (52,9%, 91/172) comparado com Matvivo30 (72,9%, 113/155). Taxa de oócitos em estágio de vesícula germinativa ($P=0,94$), metáfase I ($P=0,98$), anáfase I ($P = 0,99$) e telófase I ($P=0,20$) foram similares. No entanto, existiu diferença na taxa de oócitos em metáfase II [Matvitro – 81,0% (90/111)^a, Matvivo20 – 74,5% (35/47)^a e Matvivo30 – 41,6% (32/77)^b; $P=0,001$], degenerados [Matvitro – 5,4% (6/111)^c, Matvivo20 – 21,3% (10/47)^b e Matvivo30 – 48,1% (37/77)^a; $p=0,001$] e ativados partenogeneticamente [Matvitro – 0,0% (0/111)^b, Matvivo20 – 0,0% (0/47)^b e Matvivo30 – 9,1% (7/77)^a; $P=0,001$]. Taxas de poliespermia ($P=0,18$) e degenerados ($P=0,98$) foram semelhantes. No entanto, existiu maior ($P=0,05$) taxa de oócitos fertilizados no Matvivo (60,6%, 60/99) do que no Matvitro (46,6%, 48/103). Conclui-se que oócitos maturados *in vivo* por 20 h após a IIFO não compromete a cinética de maturação nuclear e aumenta a capacidade de fertilização *in vitro* do oócito. No entanto, o aumento na permanência do oócito no folículo pré ovulatório por 10 h diminui a proporção de oócitos viáveis. Assim, a fase de maturação oocitária não é o fator limitante da baixa produção de embriões IIFO.

Palavras-chave: embrião, intrafolicular, TIFOI.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the *in vitro* nuclear maturation and fecundation kinetics of oocytes injected into pre-ovulatory follicles of synchronized cows using the intra-follicular oocyte injection (IFOI) technique. In experiment 1, 438 immature abattoir-bovine cumulus oophorus complexes (COCs) of grades I, II and III were blocked for quality and randomly allocated to one of three groups: Matvitro (n=111), COCs matured *in vitro* for 22 h; Matvivo20 (n=172) and Matvivo30 (n=155), 30 oocytes were injected into each pre-ovulatory follicle of pre-synchronized recipients. In Matvivo20, oocytes were matured for 19.8 ± 0.1 h and in Matvivo30, for 28.3 ± 0.1 h. All cows received 12.5mg of LH (Lutropin, Bioniche, Canada) at IFOI (Matvivo20) or 10 h after IFOI (Matvivo30). Oocytes from Matvivo20 and 30 were aspirated 20 h after LH injection for assessment of oocyte maturation and recovery rates. Oocytes were evaluated according to maturation kinetics as germinal vesicle, metaphase I, anaphase I, telophase I, metaphase II, parthenogenetically activated and degenerate (chromosomal aberrations, presence of diffuse or indefinite chromatin). In experiment 2, immature abattoir-bovine COCs (n=202) of grades I, II and III were blocked for quality and randomly distributed into two groups: Matvitro (n=103), COCs were matured and fertilized *in vitro*; Matvivo (n=99), same Matvivo20 protocol, and COCs fertilized *in vitro*. Presumptive zygotes were evaluated as fertilized, unfertilized or polyspermic. Statistical analyses were performed by the GLIMMIX procedure of SAS. Recovery rate was lower ($P < 0.001$) in Matvivo20 (52.9%, 91/172) compared to Matvivo30 (72.9%, 113/155). Germinal vesicle ($P = 0.94$), metaphase I ($P = 0.98$), anaphase I ($P = 0.99$) and telophase I ($P = 0.20$) rates were similar. However, there were differences in metaphase II [Matvitro- 81.0% (90/111)a, Matvivo20 - 74.5% (35/47)a, and Matvivo30- 41.6% (32/77)b; $P=0.001$], degenerate [Matvitro- 5.4% (6/111)c, Matvivo20- 21.3% (10/47)b and Matvivo30- 48.1% (37/77); $P=0.001$] and parthenogenetically activated [Matvitro- 0.0% (0/111)b, Matvivo20- 0.0% (0/47)b and Matvivo30- 9.1% (7/77)a; $P=0.001$]. Polyspermic ($P = 0.18$) and abnormal ($P = 0.98$) rates were similar. However, there was a higher rate ($P=0.05$) of fertilized oocytes in Matvivo (60.6%, 60/99) than in Matvitro (46.6%, 48/103). In conclusion, oocyte maturation *in vivo* after IFOI for 20 h does not alter maturation kinetics and increases *in vitro* oocyte fertilization capacity. However, the 10h-increased in intra-follicular oocyte permanence decreased the proportion of viable oocytes. Thus, the oocyte maturation phase is not the limiting causative factor for the low IFOI-embryo production rates.

Keywords: embryo, intrafollicular, IFOT.

Introdução

A produção de embriões bovinos pode ser realizada por técnicas *in vivo* e *in vitro*. Apesar do maior número de embriões produzidos *in vivo*, observa-se maior crescimento na produção *in vitro* de embriões (PIV) nos últimos anos [1]. Na produção de embriões *in vivo* é necessário promover a superestimulação ovariana para promover múltiplas ovulações [2]. Para isso, é importante determinar o dia da emergência da onda folicular para realizar a suplementação com FSH que consiste na administração dessa gonadotrofina duas vezes ao dia durante quatro dias [3]. Dessa forma, é necessária a realização de diversos manejos nas vacas doadoras para promover a produção de embriões [4], o que aumenta a possibilidade de falhas durante o processo de preparação das doadoras para a colheita de embriões [5]. Além disso, as vacas são submetidas à estresse hormonal de estrogênio e progesterona durante a superestimulação ovariana [6] e formação de vários corpos lúteos [7]. Devido a esse estresse hormonal e morfológico, as doadoras de embriões somente podem ser submetidas a nova superestimulação após 30 dias [5]. Por fim, protocolos de superestimulação ovariana apresentam baixa resposta em 20-30 % das vacas doadoras de embriões [8]. Tais dificuldades da produção *in vivo*, não são observadas na produção *in vitro* de embriões que consiste em realizar *in vitro* a maturação e fecundação de oócitos e crescimento inicial do embrião [9]. Na PIV não há necessidade de promover estresse hormonal nas doadoras para a produção de embriões, o que permite realizar essa técnica com maior frequência do que a produção *in vivo* de embriões [10]. No entanto, somente 30 -50% dos oócitos maturados e fecundados *in vitro* se desenvolvem a embriões [11] e os embriões produzidos possuem menor qualidade devido às diferenças na ultraestrutura [12], conteúdo lipídico [13], morfologia [14] e padrão de expressão gênica em relação a embriões produzidos *in vivo* [15, 16]. Tais alterações no embrião produzido *in vitro* aumentam as perdas embrionárias precoces, morte fetal e promove a síndrome de fetos gigantes [17]. Além disso, embriões produzidos *in vitro* possuem menor criotolerância [18] o que dificulta a disseminação dessa biotecnologia.

Uma alternativa para melhorar a qualidade embrionária, diminuir a quantidade de manejos necessários para produção *in vivo* de embriões e evitar a utilização do processo de produção *in vitro* é a técnica de injeção intrafolicular de oócitos [19]. A injeção intrafolicular de oócitos (IIFO) consiste em injetar oócitos imaturos em folículo pré ovulatório, inseminar a vaca receptora de oócitos após a IIFO com dose única de sêmen e coletar os embriões sete dias depois [20, 21]. No entanto, a produção de embriões por IIFO é baixa (12,9% [21] e 17,3% [20]) e variável entre as vacas receptoras de oócitos. Dessa forma, é importante

verificar as etapas de formação e desenvolvimento embrionário. Os processos de maturação e fecundação de oócitos podem interferir na produção de embriões, sendo eventos importantes para o sucesso dessas biotecnologias [11, 22]. Além disso, a qualidade oocitária, o tempo e o meio de maturação dos oócitos podem influenciar a fertilização [23]. Dessa forma, os processos de maturação e fertilização dos oócitos injetados em folículo dominante podem interferir na produção de embriões. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar a maturação nuclear e a fecundação de oócitos injetados em folículo pré ovulatório de vacas receptoras utilizando a técnica de IIFO.

1. Material e Métodos

1.1. Experimento 1: Avaliação do tempo de maturação oocitária intrafolicular

1.1.1. Local e animais do experimento

O experimento foi conduzido na fazenda Córrego da Prata em Bom Sucesso, MG, Brasil. Foram utilizadas 16 vacas *Bos indicus* não lactantes, com escore de condição corporal de $2,75 \pm 0,00$ (escala de 1 – 5), mantidas em piquetes de *Brachiaria decumbens*, com livre acesso à água e sal mineral. As análises de cinética de maturação nuclear foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal da EMBRAPA – CENARGEN, Brasília, DF, Brasil.

1.1.2. Delineamento experimental

Os complexos *cumulus* oócitos (CCOs) recuperados (n=438) de ovários de abatedouro foram distribuídos aleatoriamente em um de três grupos experimentais (grupo Matvitro, grupo Matvivo20 e grupo Matvivo30). No grupo Matvitro, os CCOs (n=111) foram maturados *in vitro* por 22 a 24 horas. No Grupo Matvivo20, os CCOs (n=172) distribuídos em 9 seções de IIFO, foram maturados *in vivo* por 20 horas em folículo pré ovulatório (FD) de vacas previamente sincronizadas. No Grupo Matvivo30, os CCOs (n=155) distribuídos em 7 seções de IIFO, foram maturados *in vivo* por 30 horas em folículo pré ovulatório de vacas previamente sincronizadas. Para isso, as vacas receptoras de oócitos foram sincronizadas utilizando protocolo de sincronização da ovulação à base de progesterona/estradiol. As vacas receberam um dispositivo intravaginal contendo 1g de progesterona (P4; Sincrogest®, Ourofino Agronegócio, São Paulo, Brasil) e 2mg de benzoato de estradiol i.m. (Sincrodiol®,

Ourofino Agronegócio, São Paulo, Brasil). Oito dias depois (D8), as vacas receberam 500µg de PGF2α (Cloprostenol sódico; Sincrocio®, Ourofino Agronegócio, São Paulo, Brasil) e o dispositivo de P4 foi removido. Porém, esse manejo do D8 no grupo Matvivo30 foi realizado 10 horas depois do grupo Matvivo20. No grupo Matvivo20, as vacas foram submetidas à injeção intrafolicular de oócitos (IIFO) 46 horas após a retirada do implante de progesterona concomitante a administração de 12,5mg de LH (Lutropin-V®, Bioniche, Ontario, Canadá). No grupo Matvivo30, as vacas foram submetidas à injeção intrafolicular de oócitos 36 horas após a retirada do implante de progesterona e 10 horas após a IIFO receberam 12,5mg de LH. Após o período de maturação *in vivo*, os folículos pré ovulatórios foram aspirados com auxílio de ultrassonografia para a recuperação dos CCOs injetados. Os CCOs recuperados foram desnudados por sucessivas pipetagens, fixados em solução de 3:1 de etanol e ácido acético glacial para posterior avaliação da cinética de maturação oocitária (Figura 1).

1.1.3. Recuperação e seleção de oócitos

Os oócitos utilizados no experimento foram obtidos de ovários de abatedouro. Imediatamente após o abate, os ovários foram transportados em solução salina 0,9% (NaCl) com 100 µg/ml de estreptomicina e 100 UI/ml de penicilina G à temperatura de 35-37°C. O tempo de coleta do abate até o momento da injeção intrafolicular não excedeu 3 horas. Os CCOs foram aspirados de folículos com diâmetro de 3-8 mm com auxílio de seringa de 5ml e agulha 18G e depositados em tubos plásticos de 15ml para sedimentação. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e o precipitado vertido em placa de cultivo celular 100 x 20 mm contendo tampão fosfato salina modificado por Dulbecco (DMPS) com 0,1 % de álcool polivinílico (PVA) para avaliação e seleção dos CCOs em estereomicroscópio. Os CCOs foram avaliados e classificados conforme a homogeneidade do citoplasma e número de camadas compactas de células do cumulus nas seguintes categorias: I, II, III, desnudos e atrésicos [24].

1.1.4. Maturação *in vitro*

Imediatamente após a seleção, os CCOs grau I, II e III foram mantidos em meio de transporte [TCM 199 (Gibco) suplementado com 10% SFB (Gibco)] e levados até o Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Lavras (UFLA). No

laboratório, os CCOs foram lavados em duas gotas de 100µL de meio de maturação (TCM 199 suplementado com 10% SFB, 5µg/ml FSH, 50µg/ml LH e 01µg/ml de estradiol; MIV, Vitrogen, São Paulo, Brasil) e em seguida, maturados *in vitro* em incubadora a 38,5°C com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada por 22 a 24 horas em placas de 4 poços contendo 400µL de meio de maturação, com no máximo 30 estruturas por poço.

1.1.5. Injeção intrafolicular de oócitos (IIFO)

No dia da IIFO, os animais foram avaliados previamente por ultrassonografia para mensuração e localização do folículo dominante. A IIFO foi realizada por linha de aspiração de teflon de 1,7mm de diâmetro e 80cm de comprimento (WTA, Cravinhos, SP, Brasil) acoplada a uma agulha descartável 24G em uma extremidade e na outra uma seringa de 1ml. O sistema foi preenchido com solução aquecida de DMPBS e heparina (5000 UI/ml). Após preenchimento do sistema, 30 CCOs foram colocados na agulha com 60µl da solução (DMPBS + heparina) por pressão negativa criada no sistema. Em seguida, o sistema foi inserido na guia de aspiração folicular transvaginal (WTA, Cravinhos, SP, Brasil), contendo uma probe micro-convexa de 7,5MHz (Aloka SSD500, Japão), que foi posicionada no fornix vaginal ipsilateral ao ovário que continha o folículo pré ovulatório. Após o posicionamento da guia de aspiração e visualização do folículo pré ovulatório, 60µl de solução de DMPBS e heparina e os CCOs foram injetados no folículo. Em seguida, o sistema foi lavado com solução de 0,1% de PVA em placa de cultivo celular de 100x20mm. A injeção dos CCOs foi confirmada pela visualização de pontos hiperecoicos no folículo e pela ausência de CCOs na placa de petri após a lavagem.

1.1.6. Aspiração folicular guiada por ultrassonografia

No dia da aspiração folicular (66 horas após a retirada do implante), as vacas foram previamente avaliadas para mensuração do folículo pré ovulatório. Em seguida, uma probe micro-convexa com frequência 7,5 MHz (Aloka SSD500, Japão) foi introduzida até o fornix vaginal com auxílio de uma guia de aspiração folicular (Guia de aspiração, WTA, Cravinhos, SP, Brasil). A punção do folículo pré ovulatório foi realizada por linha de aspiração de teflon de 1,7 mm de diâmetro e 80 cm de comprimento (Linha de aspiração, WTA, Cravinhos, SP, Brasil), acoplada a uma agulha descartável 20G (WTA, Cravinhos, SP, Brasil) e inserido na

guia de aspiração folicular. Todo o sistema de aspiração folicular foi submetido a uma pressão negativa entre 10 a 15 ml de água/minuto (60 a 70 mmHg) produzida por uma bomba de vácuo (WTA, Cravinhos, SP, Brasil). O folículo pré ovulatório foi puncionado e seu conteúdo direcionado para tubo plástico de 4ml contendo 0,5ml de solução de DMPBS e heparina à temperatura entre 35 e 36°C. O tubo com o material aspirado foi conduzido ao laboratório e seu conteúdo vertido em placas de cultivo celular de 100 x 20 mm contendo DMPBS com 0,1% de PVA para busca e contagem dos CCOs sob estereomicroscópio. Após esse procedimento, os oócitos foram submetidos à avaliação da cinética de maturação nuclear.

1.1.7. Avaliação da cinética de maturação nuclear

CCOs recuperados foram expostos à solução com 0,3% de hialuronidase por um período de 5 minutos, e posteriormente submetidos a sucessivas pipetagens para retirada das células do *cumulus*. Após este procedimento, oócitos foram fixados em solução de etanol e ácido acético glacial (3:1) por no mínimo 48 horas. Os oócitos fixados foram colocados entre lâmina e lamínula e corados com lacmóide (Sigma, Sto. Louis, MO, USA) a 45% em ácido acético glacial por 10 minutos.

A avaliação da cinética de maturação nuclear foi realizada em microscópio de contraste de fase (Nikon Eclipse E200,1000X) e classificados em vesícula germinativa (VG), metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI), metáfase II (MII) com alinhamento dos cromossomos na placa metafásica e extrusão do 1° corpúsculo polar, ativados partenogeneticamente (presença de pró-núcleo feminino) e degenerados (aberrações cromossômicas, presença de cromatina difusa ou indefinida).

1.2. Experimento 2: Avaliação da fecundação *in vitro* de oócitos injetados e maturados em folículo pré ovulatório

1.2.1. Local e animais do experimento

O experimento foi conduzido no campus da UFLA, Lavras, MG, Brasil. Foram utilizadas seis vacas *Bos indicus* não lactantes, com ECC de $3,3 \pm 0,20$ (escala de 1 – 5), mantidas em piquetes de *Brachiaria decumbens*, com livre acesso à água e sal mineral.

1.2.2. Sincronização da ovulação, recuperação e seleção de oócitos

No estudo, as vacas receberam o mesmo protocolo de sincronização da ovulação utilizado no grupo Matvivo20 do experimento 1. O transporte e a aspiração dos ovários, a recuperação e seleção dos CCOs foram semelhantes aos realizados no experimento 1.

1.2.3. Delineamento experimental

Os CCOs recuperados (n=202) de ovários de abatedouro foram distribuídos em dois grupos experimentais (Grupos Matvitro e Matvivo). No grupo Matvitro (n=103), os CCOs foram maturados e fertilizados *in vitro*. No Grupo Matvivo (n=99) foram realizadas 12 seções de IIFO. Nessas seções, 30 CCOs foram injetados em folículo pré ovulatório de vacas previamente sincronizadas 46 horas depois da retirada do implante de progesterona semelhante ao grupo Matvivo20 do experimento 1. Os CCOs permaneceram no folículo pré ovulatório por 20 horas após a injeção dos oócitos. Após esse período, foi realizada a aspiração do folículo pré ovulatório com auxílio de ultrassonografia para a recuperação dos CCOs injetados. Os CCOs recuperados foram levados ao laboratório para ser submetidos a fertilização *in vitro*.

1.2.4. Maturação *in vitro*, IIFO e aspiração folicular guiada por ultrassonografia

Após a recuperação e seleção, os CCOs do grupo Matvitro foram lavados em duas gotas de 100 µL de meio de transporte e em duas gotas de 100 µL de meio de maturação. Em seguida, foram colocados em placas de 4 poços contendo 400µl de meio de maturação, com no máximo 30 CCOs por poço e maturados *in vitro* conforme descrito no experimento 1. Os procedimentos de IIFO e aspiração folicular guiada por ultrassonografia foram semelhantes aos realizados no experimento 1.

1.2.5. Fecundação *in vitro*

Após a maturação, os CCOs dos grupos foram fertilizados com espermatozoides descongelados (palheta de 0,25 mL) de um único touro com motilidade pós-descongelamento

acima de 50% e vigor maior que 2,0. Nas fertilizações *in vitro* (FIV) foram utilizadas palhetas da mesma partida de sêmen para os diferentes grupos. O sêmen foi descongelado em banho-maria a 37°C por 30 segundos e posteriormente selecionado pelo gradiente de Percoll (45% e 90%, 400 µL cada), preparados em microtubos de 2mL e centrifugado por 6 minutos a 600g. Após esse período, o pellet obtido foi submetido a centrifugação em 400 µL de meio Fert-TALP (Vitrogen, Cravinhos, SP, Brasil) acrescido de soluções de penicilamida, hipotaurina e hepinefrina (PHE) e 10 µg/ml de heparina por 4 minutos a 600g. O pellet obtido desse processo foi ressuspenso em 50 µL de meio FERT-TALP associado a PHE e heparina. Antes e após a realização do gradiente de Percoll, foram avaliadas a motilidade espermática e o vigor do sêmen utilizado para a fecundação dos oócitos. A fecundação *in vitro* foi realizada em gotas de meio Fert-TALP acrescido de soluções de PHE e 10 µg/ml de heparina cobertas com óleo mineral (Vitrogen, Cravinhos, SP, Brasil) na proporção de 2,4 a 3,0µL de meio por oócito, utilizando concentração espermática ajustada para $1,0 \times 10^6$ espermatozoides/mL durante o período de 18 horas.

1.2.6. Avaliação da taxa de fecundação *in vitro*

Após a fecundação *in vitro*, os futuros zigotos foram submetidos a sucessivas pipetagens para a retirada das células do cumulus e espermatozoides acessórios e fixados em solução de etanol e ácido acético glacial (3:1) por no mínimo 48 horas. Os zigotos fixados foram colocados entre lâmina e lamínula e corados com lacmóide (Sigma, Sto. Louis, MO, USA) a 45% em ácido acético glacial por 10 minutos. A avaliação da fecundação foi realizada em microscópio de contraste de fase (Nikon Eclipse E200,1000X) e as estruturas classificadas em não fecundado (NF; sem a presença de material genético masculino), fecundado (FEC; presença de dois pró núcleos), polispermia (POL; presença de mais de 2 pró núcleos ou mais de um material genético masculino) e degenerados.

2. Resultados

No experimento 1, três seções de IIFO do grupo Matvivo20 foram desconsideradas pois no momento da aspiração folicular para recuperação dos oócitos injetados as vacas estavam ovuladas. O diâmetro do FD no momento da IIFO foi de $12,4 \pm 0,8$ mm para o grupo Matvivo20 e de $13,0 \pm 0,7$ mm para o grupo Matvivo30 e o número de oócitos injetados foi de

28,6±0,8 para o grupo Matvivo20 e 31,0±0,9 para o grupo Matvivo30. No grupo Matvitro foram maturados *in vitro* 29,3±1,5 oócitos. Os CCOs foram maturados *in vivo* por 19,8±0,3h no grupo Matvivo20 e por 28,3±0,2h no grupo Matvivo30. No dia da aspiração folicular, o diâmetro do folículo foi de 13,4±0,9 para o grupo Matvivo20 e 14,4±1,0 para o grupo Matvivo30. Após a OPU, a taxa de recuperação de oócitos foi diferente entre os grupos [Matvivo20 - 52,91% (91/172) e Matvivo30 - 72,90% (113/155); P=0,001]. Durante o processo de remoção de células do cumulus, fixação e montagem de lâminas para avaliação da cinética de maturação nuclear foram perdidos 4,5% dos oócitos no grupo Matvitro, 48,4% dos oócitos no grupo Matvivo20 e 31,9% dos oócitos no Matvivo30. Na cinética de maturação nuclear, verificou-se que as taxas de oócitos em estado de vesícula germinativa (P=0.94), em metáfase I (P=0.98), em anáfase I (P=0.99) e em telófase I (P=0.20) foram semelhantes entre os grupos experimentais. No entanto, verificou-se menor taxa de oócitos em metáfase II [Matvitro - 81.0% (90/111)^a, Matvivo20 - 74.5% (35/47)^a e Matvivo30 - 41,6% (32/77)^b; P=0.001], maior taxa de oócitos degenerados [Matvitro - 5.4% (6/111)^c, Matvivo20 - 21.3% (10/47)^b e Matvivo30 - 48.1% (37/77)^a; P=0.001] e maior taxa de oócitos ativados partenogeneticamente [Matvitro - 0.0% (0/111)^b, Matvivo20 - 0.0% (0/47)^b e Matvivo30 - 9.1% (7/77)^a; P=0.001] no grupo Matvivo30 (Tabela 1).

No experimento 2, três seções de IIFO foram desconsideradas devido as vacas estarem ovuladas no momento da aspiração folicular para a recuperação dos oócitos injetados. O diâmetro do FD no momento da IIFO foi de 14,9±1,1mm e o número de oócitos injetados foi de 29,8±0,7 por folículos injetados. Na fecundação *in vitro*, observou-se que as taxas de poliespermia (P=0,18) e de degenerados (P=0,98) foram semelhantes entre os grupos. Porém, verificou-se maior taxa de oócitos fecundados no grupo Matvivo (P=0,05; Figura 2).

3. Discussão

Para o nosso conhecimento esse é o primeiro estudo que relata a cinética de maturação e a fecundação *in vitro* de oócitos injetados em folículo pré ovulatório. No estudo, a cinética de maturação foi semelhante entre os grupos de oócitos maturados *in vivo* por 20 horas e o grupo de oócitos maturados *in vitro*, porém, a fecundação *in vitro* foi maior nos oócitos maturados *in vivo*. Além disso, a taxa de maturação foi menor em oócitos maturados *in vivo* por 30 horas em folículos pré ovulatório. Tais achados confirmam parcialmente a hipótese do estudo. Durante o processo de meiose das células germinativas, o oócito permanece estacionado na fase de prófase I devido a fatores presentes no fluido folicular que inibem a

progressão da meiose [25, 26]. A alta concentração de GMPc no fluido folicular inibe a ativação da enzima fosfodiesterase tipo 3 (PDE-3), mantendo elevada a concentração de AMPc no oócito [27]. Altas concentrações de AMPc impedem a ativação do fator promotor de maturação (MPF), responsável pela reassunção da meiose e progressão até metáfase II [28]. Trabalhos demonstraram que a maturação de oócitos *in vitro* com fluido folicular de folículo dominante retarda a cinética de maturação nuclear oocitária [29-31]. O processo de retomada da meiose e progressão até metáfase II ocorre *in vivo* somente após o pico de LH. No entanto, a remoção do oócito do ambiente folicular permite a retomada espontânea da meiose [32]. Dessa forma, o tempo necessário para que o oócito complete o processo de maturação nuclear *in vivo* é de 22 a 24 horas após o pico de LH [33, 34]. Em função disso, o período de maturação *in vitro* dos oócitos é de 18 a 24 horas [35]. Assim, a cinética de maturação nuclear entre os grupos Matvitro e Matvivo20 foi semelhante. No entanto, apesar do tratamento com LH ser realizado 20 horas antes da aspiração folicular, observou-se menor taxa de maturação e maior taxa de oócitos degenerados em oócitos maturados por 30 horas em folículos pré ovulatório. De forma semelhante, o aumento no período de maturação *in vitro* reduziu as taxas de maturação oocitária, aumentou a proporção de oócitos degenerados [36] e diminuiu a produção de embriões [35]. Na literatura observa-se que oócitos de folículos persistentes são ativados prematuramente [37] devido ao período maior de exposição dos oócitos a maior frequência de pulsos de LH que antecede o pico pré ovulatório [38]. Essa condição de ativação prematura do oócito é observada em vacas de alta produção com prolongado período de proestro devido ao aumento do metabolismo de esteroides pela maior ingestão de matéria seca [39]. O aumento do intervalo (início do estro a ovulação) foi associado a menor fertilidade de vacas de leite de alta produção, devido provavelmente a ovulação de oócitos ativados prematuramente [33]. Sendo assim, o ambiente folicular pré indução do pico de LH no grupo de oócitos maturados por 30 horas no folículo pré ovulatório não impediu a maturação nuclear dos oócitos resultando em maior taxa de oócitos degenerados.

No presente estudo, a taxa de fecundação *in vitro* foi maior no grupo de oócitos maturados *in vivo* demonstrando que a maturação de vários oócitos imaturos em um único folículo pré ovulatório não altera a capacidade do oócito ser fecundado *in vitro*, sendo até maior do que a maturação *in vitro*. A maturação oocitária compreende eventos nucleares e reorganização das organelas citoplasmáticas que preparam o oócito para a fecundação [40]. Além disso, a fertilização é um processo multifatorial que inclui interação e fusão entre oócito e espermatozoide e início do desenvolvimento embrionário [41], sendo importante na

determinação da competência do oócito [42]. Na maturação *in vitro*, observa-se assincronia entre os processos de maturação nuclear, citoplasmática e das células do cumulus [11]. Além disso, o padrão de expressão de genes relacionados com o desenvolvimento embrionário que reduz a possibilidade de fecundação altera-se em oócitos maturados *in vitro* [15]. Dessa forma, a competência para se desenvolverem até blastocisto é maior nos oócitos maturados *in vivo* [11, 15]. Assim, conclui-se que maturação de oócitos *in vivo* após IIFO por 20 horas não compromete a cinética de maturação e melhora a capacidade de fecundação *in vitro*, provavelmente não sendo esse o fator responsável pelos baixos índices observados na técnica de IIFO. No entanto, o aumento da permanência de oócitos injetados em folículo pré ovulatório por 10 horas diminui a proporção de oócitos viáveis para a fecundação.

Referências

- [1] Blondin P. Status of embryo production in the world. *Animal Reproduction*. 2015;12:356-8.
- [2] Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction, nutrition, development*. 2002;42:601-11.
- [3] Oliveira AC, Mattos MC, Bastos MR, Trinca LA, Razza EM, Satrapa RA, et al. Efficiency of superstimulatory protocol P-36 associated with the administration of eCG and LH in Nelore cows. *Theriogenology*. 2014;82:715-9.
- [4] Baruselli PS, de Sa Filho MF, Martins CM, Nasser LF, Nogueira MF, Barros CM, et al. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*. 2006;65:77-88.
- [5] Bo GA, Mapletoft RJ. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*. 2014;81:38-48.
- [6] Rasolomboahanginatovo HS, Chorfi Y, Dupras R, Mills L, Lefebvre R. Effect of superovulation on uterine and serum biochemical parameters and its potential association with transferable embryos in Holstein dairy cows. *Journal of veterinary science*. 2014;15:273-81.
- [7] Aller JF, Callejas SS, Alberio RH. Biochemical and steroid concentrations in follicular fluid and blood plasma in different follicular waves of the estrous cycle from normal and superovulated beef cows. *Animal reproduction science*. 2013;142:113-20.
- [8] Baruselli PS, Ferreira RM, Sa Filho MF, Nasser LF, Rodrigues CA, Bo GA. Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. *Reproduction, fertility, and development*. 2010;22:67-74.
- [9] Lonergan P, Fair T. Maturation of Oocytes in Vitro. *Annual review of animal biosciences*. 2015;4:255-68.

- [10] Seneda MM, Esper CR, Garcia JM, Oliveira JA, Vantini R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Animal reproduction science*. 2001;67:37-43.
- [11] Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular reproduction and development*. 2002;61:234-48.
- [12] Fair T, Lonergan P, Dinnyes A, Cottell DC, Hyttel P, Ward FA, et al. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. *Molecular reproduction and development*. 2001;58:186-95.
- [13] Crosier AE, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE, Farin CE. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. *Biology of reproduction*. 2001;64:1375-85.
- [14] Kassens A, Held E, Salilew-Wondim D, Sieme H, Wrenzycki C, Tesfaye D, et al. Intrafollicular Oocyte Transfer (IFOT) of Abattoir-Derived and In Vitro-Matured Oocytes Results in Viable Blastocysts and Birth of Healthy Calves. *Biology of reproduction*. 2015;92:1-14.
- [15] Adona PR, Leal CL, Biase FH, De Bem TH, Mesquita LG, Meirelles FV, et al. In vitro maturation alters gene expression in bovine oocytes. *Zygote*. 2016;24:624-33.
- [16] Rizos D, Lonergan P, Boland MP, Arroyo-Garcia R, Pintado B, de la Fuente J, et al. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biology of reproduction*. 2002;66:589-95.
- [17] Salilew-Wondim D, Fournier E, Hoelker M, Saeed-Zidane M, Tholen E, Looft C, et al. Genome-Wide DNA Methylation Patterns of Bovine Blastocysts Developed In Vivo from Embryos Completed Different Stages of Development In Vitro. *PLoS One*. 2015;10:1-31.

- [18] Lonergan P, Rizos D, Kanka J, Nemcova L, Mbaye AM, Kingston M, et al. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction*. 2003;126:337-46.
- [19] Bergfelt DR, Brogliatti GM, Adams GP. Gamete recovery and follicular transfer (graft) using transvaginal ultrasonography in cattle. *Theriogenology*. 1998;50:15-25.
- [20] Michael H, Ana K, Dessie SW, Harald S, Christine W, Dawit T, et al. Birth of healthy calves after intra-follicular transfer (IFOT) of slaughterhouse derived immature bovine oocytes. *Theriogenology*. 2017;97:41-9.
- [21] Spricigo JF, Sena Netto SB, Muterlle CV, Rodrigues Sde A, Leme LO, Guimaraes AL, et al. Intrafollicular transfer of fresh and vitrified immature bovine oocytes. *Theriogenology*. 2016;86:2054-62.
- [22] Dale B, DeFelice L. Polyspermy prevention: facts and artifacts? *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2011;28:199-207.
- [23] Demyda-Peyras S, Dorado J, Hidalgo M, Anter J, De Luca L, Genero E, et al. Effects of oocyte quality, incubation time and maturation environment on the number of chromosomal abnormalities in IVF-derived early bovine embryos. *Reproduction, fertility, and development*. 2013;25:1077-84.
- [24] Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Molecular reproduction and development*. 1994;37:48-53.
- [25] Dostal J, Pavlok A. Isolation and characterization of maturation inhibiting compound in bovine follicular fluid. *Reproduction, nutrition, development*. 1996;36:681-90.
- [26] van Tol HT, Bevers MM. Partial characterization of the factor in theca-cell conditioned medium that inhibits the progression of FSH-induced meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to the membrana granulosa. *Molecular reproduction and development*. 2001;60:418-24.

- [27] Rose RD, Gilchrist RB, Kelly JM, Thompson JG, Sutton-McDowall ML. Regulation of sheep oocyte maturation using cAMP modulators. *Theriogenology*. 2013;79:142-8.
- [28] Vaccari S, Weeks JL, 2nd, Hsieh M, Menniti FS, Conti M. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biology of reproduction*. 2009;81:595-604.
- [29] Choi YH, Takagi M, Kamishita H, Wijayagunawardane MP, Acosta TJ, Miyazawa K, et al. Developmental capacity of bovine oocytes matured in two kinds of follicular fluid and fertilized in vitro. *Animal reproduction science*. 1998;50:27-33.
- [30] Coleman NV, Shagiakhmetova GA, Lebedeva IY, Kuzmina TI, Golubev AK. In vitro maturation and early developmental capacity of bovine oocytes cultured in pure follicular fluid and supplementation with follicular wall. *Theriogenology*. 2007;67:1053-9.
- [31] Romero-Arredondo A, Seidel GE, Jr. Effects of follicular fluid during in vitro maturation of bovine oocytes on in vitro fertilization and early embryonic development. *Biology of reproduction*. 1996;55:1012-6.
- [32] Guimaraes AL, Pereira SA, Leme LO, Dode MA. Evaluation of the simulated physiological oocyte maturation system for improving bovine in vitro embryo production. *Theriogenology*. 2015;83:52-7.
- [33] Bloch A, Folman Y, Kaim M, Roth Z, Braw-Tal R, Wolfenson D. Endocrine alterations associated with extended time interval between estrus and ovulation in high-yield dairy cows. *Journal of dairy science*. 2006;89:4694-702.
- [34] Spricigo JF, Diogenes MN, Leme LO, Guimaraes AL, Muterlle CV, Silva BD, et al. Effects of Different Maturation Systems on Bovine Oocyte Quality, Plasma Membrane Phospholipid Composition and Resistance to Vitrification and Warming. *PLoS One*. 2015;10:1-18.

- [35] Koyama K, Kang SS, Huang W, Yanagawa Y, Takahashi Y, Nagano M. Estimation of the optimal timing of fertilization for embryo development of in vitro-matured bovine oocytes based on the times of nuclear maturation and sperm penetration. *The Journal of veterinary medical science*. 2014;76:653-9.
- [36] Heinzmann J, Mattern F, Aldag P, Bernal-Ulloa SM, Schneider T, Haaf T, et al. Extended in vitro maturation affects gene expression and DNA methylation in bovine oocytes. *Molecular human reproduction*. 2015;21:770-82.
- [37] Revah I, Butler WR. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *Journal of reproduction and fertility*. 1996;106:39-47.
- [38] Ahmad N, Beam SW, Butler WR, Deaver DR, Duby RT, Elder DR, et al. Relationship of fertility to patterns of ovarian follicular development and associated hormonal profiles in dairy cows and heifers. Cooperative Regional Research Project. *Journal of animal science*. 1996;74:1943-52.
- [39] Sangsritavong S, Combs DK, Sartori R, Armentano LE, Wiltbank MC. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17beta in dairy cattle. *Journal of dairy science*. 2002;85:2831-42.
- [40] Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*. 2006;65:126-36.
- [41] Ferre LB, Bogliotti Y, Chitwood JL, Fresno C, Ortega HH, Kjelland ME, et al. Effect of spermatozoa motility hyperactivation factors and gamete coincubation duration on in vitro bovine embryo development using flow cytometrically sorted spermatozoa. *Reproduction, fertility, and development*. 2016;29:805-14.
- [42] Dieleman SJ, Hendriksen PJ, Viuff D, Thomsen PD, Hyttel P, Knijn HM, et al. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology*. 2002;57:5-20.

Tabela 1

Cinética de maturação nuclear de oócitos bovinos imaturos injetados e maturados por 20 e 30 horas em folículo pré ovulatório.

	Matvitro	Matvivo20	Matvivo30	P
Oócitos %, (n/n)				
Vesícula germinativa	0,0% (0/111)	2,1%(1/47)	1,3%(1/77)	0,94
Metáfase I	0,0% (0/111)	0,0% (0/47)	0,0% (0/77)	0,98
Anáfase I	0,9% (1/111)	0,0% (0/47)	0,0% (0/77)	0,99
Telófase I	12,6% (14/111)	2,1% (1/47)	0,0% (0/77)	0,20
Metáfase II	81,0% (90/111) ^a	74,5% (35/47) ^a	42,6% (32/77) ^b	0,001
Ativados partenogeneticamente	0,0% (0/111) ^b	0,0% (0/47) ^b	9,1% (7/77) ^a	0,001
Degenerados	5,4% (6/111) ^c	21,3% (10/47) ^b	48,1% (37/77) ^a	0,001

Letras diferentes entre colunas diferem estatisticamente

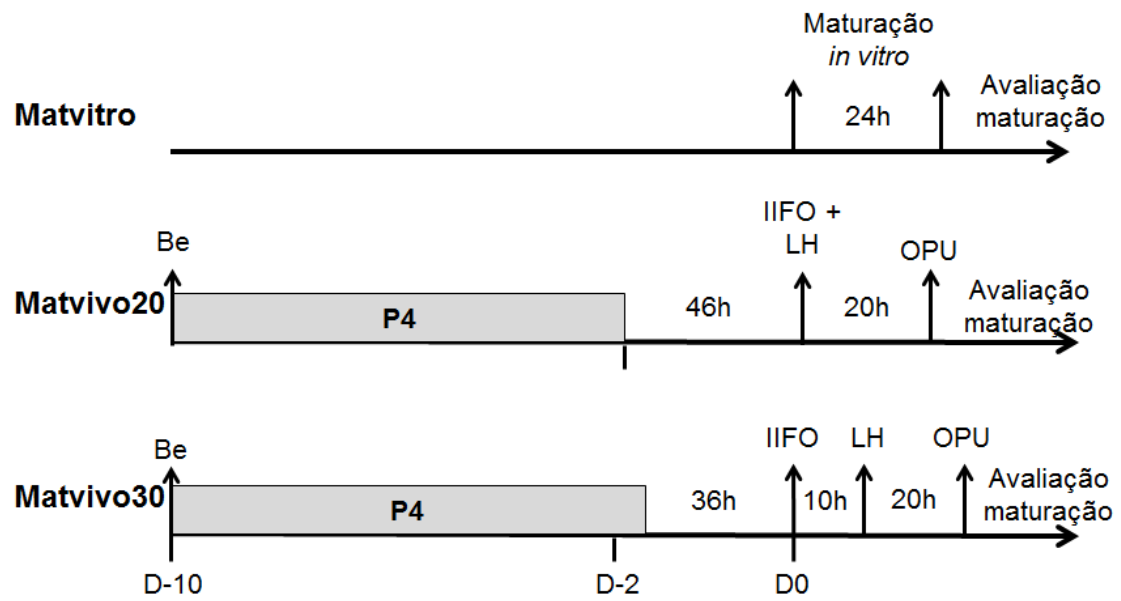


Figura 1: Desenho experimental Experimento 1.

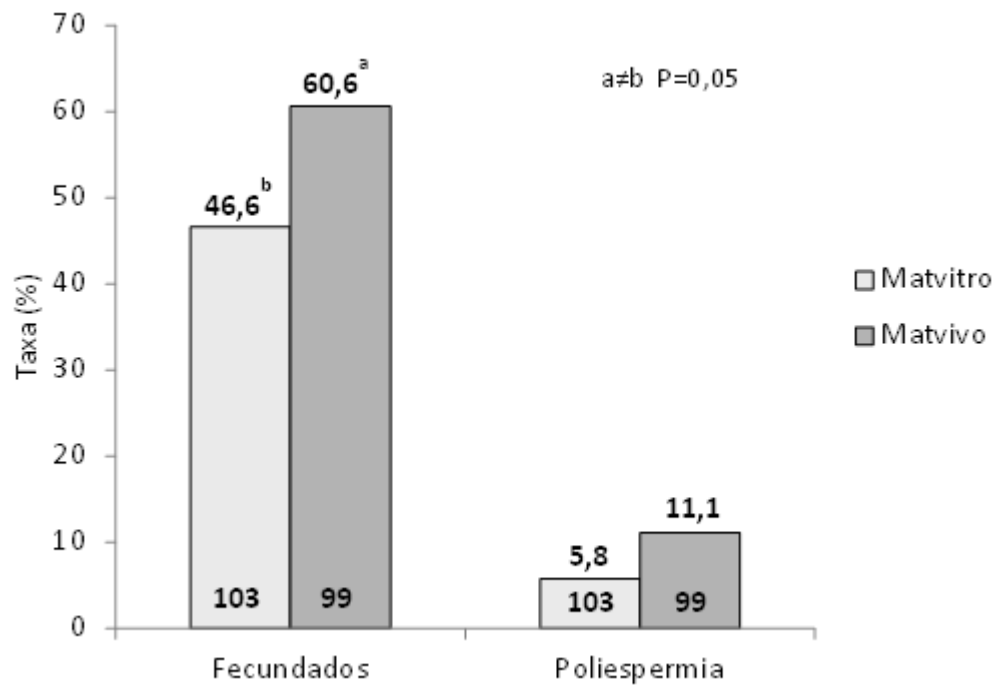


Figura 2: Taxa de fecundação *in vitro* e poliespermia de oócitos maturados em folículo pré ovulatório por 20 horas após IFO.