

## A SUBSTITUIÇÃO DO MEIO TCM PELO MEIO BARC, SUPLEMENTADO COM SFB, BSA OU PVA, PARA A MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS *IN VITRO*, NÃO INCREMENTA A SUBSEQUENTE PRODUÇÃO DE BLASTOCISTOS

Jéssica de Oliveira Caldeira<sup>1</sup>  
Diego Gouvêa de Souza<sup>2</sup>  
Renata Sanches Calegari<sup>2</sup>  
Daniela Martins Paschoal<sup>2</sup>  
José Mateus Sudano<sup>2</sup>  
Alicio Martins Júnior<sup>1</sup>

### RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo verificar a influência do meio de cultivo de embriões bovinos “Beltsville Agriculture Research Center” (BARC), suplementado com SFB, BSA e PVA, separadamente, sobre a maturação de oócitos *in vitro*, evidenciada pela taxa de clivagem e formação de blastocistos em diferentes estágios de desenvolvimento. Três experimentos foram efetuados, de acordo com o seguinte delineamento experimental: exp.1: SFB foi adicionado ao meio BARC nas concentrações de 0, 5 e 10%; exp. 2: BSA foi adicionada ao meio BARC nas concentrações de 0, 4 e 8 mg/mL; exp. 3: PVA foi adicionado ao meio BARC nas concentrações de 0, 0,5 e 1 mg/mL. O meio de cultura TCM 199, acrescido de bicarbonato, piruvato, gentamicina, FSH, LH e SFB, foi utilizado como grupo controle. Os oócitos, obtidos de ovários de vacas destinadas ao abate comercial, foram selecionados em meio PBS e, a seguir, maturados em meio BARC acrescido de FSH, LH, gentamicina e as respectivas macromoléculas. A seleção espermática foi realizada em gradiente de Percoll, utilizando o meio TALP para a FIV. O cultivo *in vitro* dos embriões foi em meio SOF modificado; todas as etapas foram realizadas em incubadora a 5% de CO<sub>2</sub> em ar, a 38,7 °C, atmosfera úmida. O número de oócitos que clivou e atingiu os estágios de blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido foi registrado, respectivamente, as 72 e 168 horas pós-inseminação. ANOVA e teste *t* de Bonferroni foram empregados para a análise estatística, com P<0,05 sendo considerado significativo. Maior porcentagem (P<0,05) de oócitos que clivaram foi observada no grupo TCM + SFB do que nos grupos maturados em meio BARC com SFB ou BSA, independentemente da concentração adotada. Contudo, a taxa de fertilização foi similar entre os grupos BARC + PVA com 1 mg/mL (85,7%) e TCM + SFB (90,8%). Diferença significativa (P<0,05) foi constatada entre os grupos para o desenvolvimento de blastocistos, com o grupo TCM + SFB produzindo um maior número de blastocistos, em diferentes estágios (resultados variando de 47,4 a 51,4%) em comparação com os grupos utilizando BARC + SFB (4,1 a 19,7%), BSA (1,4 a 5,6%) e PVA (5,7 a 10,6%). Concluindo, o meio BARC suplementado com diferentes fontes de macromoléculas não foi eficiente em promover adequada maturação dos oócitos bovinos *in vitro*, resultando em uma baixa taxa de fertilização e de produção de blastocistos, em comparação com o meio TCM + SFB.

**Palavras-chave:** meio TCM, meio BARC, maturação de oócitos, bovinos

<sup>1</sup> Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Laboratório de Biotecnologia de Reprodução Animal - Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, UNESP. Correspondência

<sup>2</sup> Departamento de Radiologia Veterinária e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

## REPLACING TCM WITH BARC MEDIUM SUPPLEMENTED WITH FCS, BSA OR PVA FOR *IN VITRO* OOCYTE MATURATION DID NOT SUPPORT SUBSEQUENT BLASTOCYST PRODUCTION

### ABSTRACT

This study was carried out to assess the influence of bovine embryo culture medium Beltsville Agriculture Research Center (BARC), supplemented with FCS, BSA or PVA, on the *in vitro* oocyte maturation, evidenced by cleavage rate and blastocysts production at different developmental stages. Three experiments were performed, as follows: exp.1: addition of FCS to BARC medium at concentrations of 0, 5 and 10%; exp. 2: addition of BSA to BARC medium at concentrations of 0, 4 and 8 mg/ml; exp. 3: addition of PVA to BARC medium at concentrations of 0, 0.5 and 1.0 mg/ml. TCM 199 supplemented with bicarbonate, pyruvate, gentamicin sulfate, FSH, LH and FCS was used as control group. Oocytes obtained from cow ovaries at slaughterhouse were selected in PBS, and then matured in BARC medium supplemented with FSH, LH and gentamicin sulfate, according to the experimental design. Percoll gradient was used for sperm selection and TALP medium for IVF. *In vitro* embryo culture was in SOF-m medium; a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>, in air, at 38.7°C was used for all steps. The number of oocytes reaching blastocyst, expanded blastocyst, and hatched blastocyst stages was recorded, respectively at 72 and 168 h post-insemination. ANOVA and Bonferroni *t* test were used to determine differences among groups. Differences of P<0.05 were taken as significant. Higher percentage (P<0.05) of cleaved oocytes was observed in group TCM + FCS than for the other groups matured in BARC supplemented with FCS or BSA, regardless the concentration used. However, the cleavage rate was similar between groups BARC plus PVA with 1 mg/ml (85.7%) and TCM + FCS (90.8%). Significant difference was found among groups for the production of blastocysts, with the control group yielding a higher number of blastocysts (results ranging from 47.4 to 51.4%, in comparison with groups using BARC + FCS (4.1 to 19.7%), BSA (1.4 to 5.6%) and PVA (5.7 to 10.6%). In conclusion, BARC medium supplemented with different macromolecules did not promote a beneficial effect on *in vitro* oocyte maturation, resulting in lower rate of cleavage and blastocyst production when compared with TCM + FCS medium.

**Keywords:** TCM medium, Barc medium, oocyte maturation, bovines

## SUSTITUCIÓN DE TCM POR BARC, ENRIQUECIDO CON SFB, BSA O PVA, PARA LA MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS *IN VITRO* NO INCREMENTA LA PRODUCCIÓN POSTERIOR DE BLASTOCISTOS

### RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo verificar la influencia del medio de cultivo de embriones bovinos "Beltsville Agriculture Research Center" (BARC), complementado con SFB, BSA o PVA, en la maduración *in vitro* de ovocitos, evidenciado a través de la tasa de fecundación y formación de blastocistos en diferentes etapas de desarrollo. Se realizaron tres experimentos, a saber: EXP 1: SFB añadido al medio BARC en concentraciones de 0, 5 y 10%; EXP 2: BSA añadido al medio BARC en concentraciones de 0, 4 y 8 mg/ml; EXP. 3: PVA se utilizó en el medio BARC en concentraciones de 0, 0.5 y 1 mg/ml. El medio de cultivo TCM 199 con piruvato, gentamicina, FSH, LH y SFB se utilizó como grupo control. Los ovocitos, obtenidos de ovarios de vacas enviadas al matadero, se seleccionaron en medio

PBS y luego fueron madurados en medio BARC con FSH, LH, gentamicina y distintas macromoléculas. La selección del esperma se hizo con gradiente de Percoll, utilizando el medio TALP para la fecundación *in vitro*. Los embriones fueron cultivados en medio SOF modificado; ovocitos y embriones fueron incubados a 38,7°C, 5% de CO<sub>2</sub> en aire y atmosfera húmeda. El número de ovocitos que fertilizaron y alcanzaron los estadios de blastocisto, blastocisto expandido y blastocisto eclosionado, respectivamente, se registraron 72 y 168 horas post inseminación. Análisis de varianza y la prueba t de Bonferroni se utilizaron para el análisis estadístico, con P<0.05. Porcentaje más alto (P<0.05) de ovocitos que clivaram fue observada en el grupo TCM + SFB que en los grupos madurados en medio BARC con SFB o BSA, independientemente de la concentración utilizada. Sin embargo, la tasa de fecundación fue similar entre grupos BARC + PVA con 1 mg/ml (85,7%) y TCM + SFB (90,8%). Diferencia significativa (P<0.05) se encontró entre los grupos para el desarrollo de blastocistos, con el grupo TCM + SFB produciendo un mayor número de blastocistos, en diferentes estadios (resultados que van desde 47,4 a 51,4%) en comparación con los grupos utilizando BARC + SFB (4,1 a 19,7%), BSA (1,4 a 5,6%) y PVA (5,7 a 10,6%). En conclusión, el medio BARC complementado con diferentes macromoléculas no fue eficiente en la promoción de una adecuada maduración de ovocitos bovinos *in vitro*, resultando en una tasa de fecundación y producción de blastocistos baja, en comparación con el medio TCM con SFB.

**Palabras clave:** medio TCM, medio BARC, maduración de ovocitos, bovinos

## INTRODUÇÃO

Desde o primeiro sucesso de fertilização *in vitro*, em bovinos (1), muitos pesquisadores têm direcionado estudos para definir as condições ideais de cultura de embriões, contudo, o aprimoramento do meio de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos, ainda se faz necessário, uma vez que a taxa de desenvolvimento embrionário até o estágio de pré-implantação raramente ultrapassa 30-40%.

As condições de cultura utilizadas para dar suporte à MIV alteram profundamente o subsequente desenvolvimento do embrião (2), diminuindo a oferta de oócitos competentes. A MIV de oócitos é uma etapa limitante na produção *in vitro* (PIV) de embriões. Em condições *in vivo*, a maturação oocitária é um processo induzido, altamente orquestrado, no qual o aprisionamento meiótico, mediado pelo c-AMP, é sobrepujado pela onda de gonadotrofina antes da ovulação (3).

Segundo Van Blerkom, Bell e Weipz (4), a competência para o desenvolvimento do oócito está relacionada com a organização do citoplasma ao estágio de vesícula germinativa. A maturação do oócito envolve a retomada da meiose, a partir da prófase I (estágio de vesícula germinativa) até a extrusão do primeiro corpúsculo polar (metáfase II), expansão das células do *cumulus* e maturação do citoplasma para dar suporte à fertilização e ao desenvolvimento do embrião (5). O estágio final de maturação do oócito é de natureza dinâmica, significando que os complexos *cumulus*-oócito (CCOs) requerem diferentes componentes, tais como: ácidos graxos, aminoácidos, eletrólitos, purinas, pirimidinas e metabólitos. Os CCOs maduros consomem duas vezes mais glicose, oxigênio e piruvato do que os imaturos (6).

As células do *cumulus* fornecem ao oócito nutrientes e sinais regulatórios que facilitam a progressão da maturação, especialmente, da maturação nuclear. Entretanto, fatores secretados pelo oócito permitem a diferenciação das células do *cumulus*, a partir das células murais da granulosa, além da mucificação da camada de células do *cumulus* (7). Bender et al.

(8) demonstraram que, os metabólitos presentes no líquido intrafolicular podem afetar a maturação do oócito e subsequente desenvolvimento até blastocisto. Segundo Gendelman et al. (9), existe um efeito sazonal deletério sobre a competência de desenvolvimento do oócito, com um maior desenvolvimento embrionário na estação do inverno do que na do verão, com clivagem retardada e variação na expressão gênica na estação quente.

Durante a maturação as mitocôndrias estão sintetizando ATP para que ocorra a síntese proteica necessária para promover a maturação e, posterior, desenvolvimento embrionário (2). De acordo com Yurttas, Morency e Coonrod (10), os oócitos transcrevem e estocam uma grande quantidade de material que não tem um papel seletivo na oogênese, mas, ao contrário, são importantes para a regulação da embriogênese.

O meio de cultura de tecidos TCM 199 é largamente empregado na MIV de oócitos bovinos. Assim, a suplementação com 10% de SFB (11-18), 5% de SFB (19), 3 mg/mL de polivinilpirrolidona (20), 10% de soro de vaca no cio (21), 0,1% de BSA ou 0,1% de PVA (22), 3 mg/mL de BSA ou 10% de SFB (23), 10% de SFB ou 1 mg/mL de PVA (24) tem sido relatada. Porém, trata-se de um meio complexo, com cerca de 60 componentes em sua formulação.

Desta forma, torna-se relevante investigar os efeitos da maturação de oócitos bovinos em meio BARC (25), acrescido de SFB, BSA ou PVA. Este meio tem sido utilizado na etapa de cultura de embriões produzidos a partir de transferência nuclear de células somáticas em procedimento usual de cultivo *in vitro* (CIV) de embriões (26-28). Entretanto, seu emprego como meio base para a MIV de oócitos bovinos não está relatado na literatura, evidenciando o mérito científico e motivação da presente averiguação.

Este estudo teve como objetivo verificar a influência de diferentes concentrações de SFB, BSA e PVA, adicionados separadamente ao meio BARC, sobre a maturação de oócitos bovinos *in vitro*, avaliando-se a taxa de clivagem e o desenvolvimento embrionário até os estágios mais avançados de blastocisto.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Colheita de oócitos e maturação *in vitro* (MIV)

Ovários de vacas foram colhidos de animais abatidos em frigorífico, no máximo 30 minutos após o sacrifício. O transporte foi feito em garrafa térmica contendo solução fisiológica a temperatura de 30 a 33 °C. Folículos de 2 a 7 mm de diâmetro foram puncionados utilizando-se agulha calibre 18 G e seringa de 10 mL. O líquido folicular foi colocado em tubo de centrífuga de 15 mL e mantido a 37 °C, em Banho-Maria, para sedimentação. Todos os procedimentos subsequentes foram conduzidos à temperatura ambiente.

A maturação dos oócitos foi realizada de acordo com Martins Jr., Keskinetepe e Brackett (29), com modificações. Oócitos contendo citoplasma homogêneo e pelo menos 3 a 4 camadas de células do *cumulus* foram lavados (três vezes) e selecionados em meio PBS com sulfato de gentamicina.

Após a seleção, grupos de oócitos foram transferidos aleatoriamente para as gotas de meio de maturação (100 µL), sob óleo mineral. Dois meios base foram utilizados para a MIV. O meio TCM, suplementado com bicarbonato de sódio, piruvato, glutamina, penicilina, 1 µg/mL de FSH (Folltropin-V®, Bioniche Inc, Canadá), 5 µg/mL de LH (Lutropin®, Bioniche Inc., Canadá) e SFB (10%), constituiu o grupo controle. O meio BARC foi constituído pelos mesmos componentes do grupo controle, contudo, foi acrescido de diferentes concentrações de SFB, BSA ou PVA, como se segue: exp.1: SFB foi adicionado ao meio BARC nas

concentrações de 0, 5 e 10%; exp. 2: BSA foi adicionada ao meio BARC nas concentrações de 0, 4 e 8 mg/mL; exp. 3: PVA foi adicionado ao meio BARC nas concentrações de 0, 0,5 e 1 mg/mL. A incubação foi conduzida em estufa de cultura (Forma Scientific, USA), em atmosfera úmida, a 5% CO<sub>2</sub>, em ar, a 38,7 °C, por 24 horas.

### **Preparação do sêmen e fertilização *in vitro* (FIV)**

Para a seleção espermática foi utilizada a técnica de gradiente de Percoll (Nutricell, Campinas, Brasil). Desta forma, em tubo de centrifuga de 15 mL foi adicionado o volume de 1 mL de Percoll a 45% e, em seguida, no fundo do tubo, 1 mL de Percoll a 90%, sendo então, colocado em estufa de CO<sub>2</sub>, por 2 horas. Após esse período, uma palheta de sêmen, de um único touro da raça Simental, foi descongelada em água a 37 °C, por 30 segundos; em seguida, 400 µL do sêmen foram depositados sobre a solução de Percoll a 45% e o tubo centrifugado a 700x g, por 20 minutos.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido, os espermatozoides re-suspendidos em 3 mL de meio TALP e centrifugados (250x g), por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento diluído em 50 µL de meio FIV (TALP + PHE + heparina). Posteriormente, foi realizada a contagem espermática em câmara de Neubauer, bem como avaliada a motilidade e o vigor. Grupos de 20 oócitos foram co-incubados com espermatozoides (concentração final de 2,0 x 10<sup>6</sup>/mL x motilidade), em gotas de meio FIV, sob óleo mineral, em atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub>, em ar, a 38,7 °C, por 20 horas.

### **Cultura *in vitro* (CIV)**

Ao término da etapa de inseminação, as células do *cumulus* foram parcialmente removidas, por pipetagens sucessivas, e os prováveis zigotos transferidos para gotas (100 µL) de meio de cultura SOF-m (modificado). Decorridas 72 horas pós-inseminação (hpi), a clivagem foi verificada e 50% do meio de cultura foi substituído por meio fresco, sendo o procedimento repetido novamente às 120 hpi. A etapa de cultura (CIV) também foi realizada sob as mesmas condições de atmosfera descritas para MIV e FIV. O desenvolvimento embrionário foi monitorado, a fim de se avaliar os oócitos maturados que fertilizaram (72 hpi) e alcançaram os diferentes estágios de blastocisto às 168 hpi, respectivamente.

### **Análise estatística**

Os experimentos foram repetidos cinco vezes (mínimo de 70 oócitos/grupo), sendo os dados analisados pelo "software" (SAS/STAT). ANOVA foi aplicada para avaliar diferenças estatísticas e o teste *t* de Bonferroni para determinar diferenças entre os grupos. Cada estágio de desenvolvimento foi tomado como a proporção de oócitos maturados chegando aos estágios indicados, registrado, também, em porcentagem. Diferenças de P<0,05 foram consideradas significativas.

## **RESULTADOS**

A taxa de clivagem e a produção de blastocistos foram avaliadas, após a maturação *in vitro* de oócitos em meio BARC, suplementado com diferentes concentrações de SFB, BSA ou PVA, em comparação com o grupo controle (TCM + SFB). Os resultados obtidos no experimento 1 são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Influência de diferentes concentrações de SFB, adicionadas ao meio BARC de maturação de oócitos bovinos, em comparação com o meio TCM suplementado com 10% de SFB, sobre o subsequente desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Grupos	n	Desenvolvimento embrionário (% de oócitos)	
		C	B/Bx/Be
		72 h*	168 h**
TCM + SFB	71	62 (87,3) <sup>a</sup>	35 (49,3) <sup>a</sup>
BARC + SFB 0%	73	54 (74,0) <sup>b</sup>	03 (4,1) <sup>c</sup>
BARC + SFB 5%	71	51 (71,8) <sup>b</sup>	08 (11,3) <sup>b</sup>
BARC + SFB 10%	71	54 (76,0) <sup>b</sup>	14 (19,7) <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup> Diferentes letras na coluna denotam diferença significativa (P<0,05).

\*Clivagem

\*\* B (Blastocisto), Bx (Blastocisto expandido), Be (Blastocisto em eclosão).

Uma maior clivagem (87,3%), P<0,05) foi observada no grupo TCM + SFB do que nos grupos tendo o BARC como meio base; porém, resultados similares foram obtidos entre os tratamentos com BARC a 0 (74,0%), 5 (71,8%) ou 10% (76,0%) de SFB. Diferença significativa foi constatada entre os grupos para o número de blastocistos, sendo que o grupo TCM + SFB produziu maior porcentagem de embriões (49,3%) em comparação com os grupos com 0 (4,1%), 5 (11,3%) e 10% (19,7%) de SFB em meio BARC. Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos 5 e 10%, contudo, os resultados foram superiores aos obtidos no grupo com 0% de SFB. Na Tabela 2 são apresentados os resultados observados no experimento 2.

Tabela 2. Influência de diferentes concentrações de BSA, adicionadas ao meio BARC de maturação de oócitos bovinos, em comparação com o meio TCM suplementado com 10% de SFB, sobre o subsequente desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Grupos	n	Desenvolvimento embrionário (% de oócitos)	
		C	B/Bx/Be
		72 h*	168 h
TCM + SFB	70	66 (94,3) <sup>a</sup>	36 (51,4) <sup>a</sup>
BARC + BSA 0 mg/mL	72	47 (65,3) <sup>b</sup>	01 (1,4) <sup>b</sup>
BARC + BSA 4 mg/mL	84	56 (66,7) <sup>b</sup>	02 (2,4) <sup>b</sup>
BARC + BSA 8 mg/mL	72	54 (75,0) <sup>b</sup>	04 (5,6) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Diferentes letras na coluna denotam diferença significativa (P<0,05).

\*Clivagem

\*\* B (Blastocisto), Bx (Blastocisto expandido), Be (Blastocisto em eclosão).

Maior taxa de fertilização (P<0,05) foi observada no meio TCM suplementado com 10% de SFB do que nos grupos de tratamento com BARC, independentemente da concentração de BSA, com resultados similares entre os grupos com 0 (65,3%), 4 (66,7%) e 8 (75,0%) mg/mL de BSA. Da mesma forma, maior porcentagem de blastocistos (P<0,05) foi obtida no grupo TCM + SFB em comparação com os tratamentos em meio BARC, sem diferença significativa entre esses. Os dados do experimento 3 acham-se sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3. Influência de diferentes concentrações de PVA, adicionadas ao meio BARC de maturação de oócitos bovinos, em comparação com o meio TCM suplementado com 10% de SFB, sobre o subsequente desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Grupos	n	Desenvolvimento embrionário (% de oócitos)	
		C	B/Bx/Be
		72 h*	168 h
TCM + SFB	76	69 (90,8) <sup>a</sup>	36 (47,4) <sup>a</sup>
BARC + PVA 0 mg/mL	73	55 (75,3) <sup>b</sup>	06 (8,2) <sup>b</sup>
BARC + PVA 0,5 mg/mL	94	74 (78,7) <sup>b</sup>	10 (10,6) <sup>b</sup>
BARC + PVA 1 mg/mL	70	60 (85,7) <sup>a</sup>	04 (5,7) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Diferentes letras na coluna denotam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

\*Clivagem

\*\* B (Blastocisto), Bx (Blastocisto expandido), Be (Blastocisto em eclosão).

Não houve diferença significativa entre os grupos de tratamento com TCM + SFB e BARC (1 mg/mL de PVA) para as porcentagens de oócitos que clivaram, contudo, estes grupos produziram uma maior porcentagem de oócitos fertilizados ( $P < 0,05$ ) às 72hpi do que os grupos 0 e 0,5 mg/mL de PVA. Em relação ao número de blastocistos, o resultado observado no grupo TCM + SFB foi superior ( $P < 0,05$ ) aos observados nos grupos de tratamento com PVA, porém, nenhuma diferença estatística foi constatada entre os tratamentos com diferentes concentrações de PVA.

## DISCUSSÃO

Sendo o processo de maturação de oócitos *in vitro* uma etapa crucial na PIV de embriões, é de se esperar que, quanto mais apropriado for o meio de maturação, simulando o ambiente folicular e/ou tubárico, maior será a probabilidade de sucesso na etapa de fertilização e, conseqüentemente, na de formação de blastocistos. Desta forma, este estudo verificou os efeitos do meio BARC, comumente utilizado para cultura de embriões clonados, suplementado com SFB, BSA ou PVA, sobre a MIV de oócitos bovinos.

Embora os resultados de clivagem e de produção de blastocistos tenham sido muito baixos com o emprego do meio BARC, este é o primeiro relato da utilização desse meio de cultura para a MIV de oócitos de bovinos. Por outro lado, o meio controle (TCM + SFB) mostrou-se eficiente, como evidenciado pelos resultados obtidos, em comparação com aqueles verificados com a utilização de meio BARC, independentemente da macromolécula adicionada. Interessante que, a composição do meio BARC é similar à composição do meio SOF, o qual tem sido utilizado para a MIV de oócitos bovinos. Diferem basicamente pela presença de alguns aminoácidos (glicina, alanina e taurina) e sorbitol no meio BARC.

Como não existe menção na literatura sobre a utilização do meio BARC na MIV de oócitos, a comparação dos dados ficou prejudicada. Contudo, no presente estudo, quando o meio BARC foi comparado com o meio TCM + SFB, diferença significativa foi observada em favor do meio TCM tanto na taxa de fertilização quanto na formação de blastocistos aos diferentes estágios de desenvolvimento.

O meio SOF tem sido utilizado para a MIV de oócitos bovinos, Gandhi et al. (30) obtiveram resultados similares na produção de embriões, quando utilizaram os meios de cultura SOF + BSA (39,3%), SOF + SFB (31,8%) e TCM + SFB (47,4%) para a MIV de oócitos. Porém, observaram um menor número de células nos blastocistos produzidos em meio SOF + BSA, em comparação com o grupo SOF + SFB, além de uma menor expansão

das células do *cumulus*. Watson et al. (31) demonstraram que o meio cSOFMaa (cSOFM + “single-strength essential” [EAA] e “non essential [NEA] aminoacids”) não é somente eficaz para a cultura de embrião, mas, também, pode ser efetivamente usado como meio base para a MIV de oócitos bovinos, quando comparado com os meios TCM 199 + 10% de “newborn calf serum” (NCS), cSOFM + 10% NCS e cSOFM.

Nossos resultados de produção de blastocistos, obtidos com o emprego de meio BARC, acrescido de BSA ou PVA, em diferentes concentrações, também foram inferiores ao observado para o meio TCM + SFB. Contudo, Ali e Sirard (32), comparando diferentes suplementos proteicos (BSA-V, BSA purificado, BSA-FAF, albumina de ovo de galinha e SFB), além de duas macromoléculas sintéticas (PVA e PVP-40 e PVP-360), adicionados ao meio SOF, verificaram que a presença de PVP-40 (8 mg/mL), durante a MIV de oócitos bovinos, aumentou significativamente a produção de mórula e blastocisto. Contudo, em nosso estudo, a taxa de fertilização de oócitos em meio TCM + SFB foi similar à observada para o meio BARC com 1 mg/mL de PVA. Tal achado está em concordância aos relatados por Ali e Sirard (32). O efeito benéfico de moléculas não proteicas, sintéticas, como o PVA, não está bem definido, porém, parece ser decorrente de uma ação direta sobre a membrana do oócito (17). Da mesma forma, efeito positivo com a utilização de BSA-FAF (8 mg/mL) no meio base SOF, para MIV, foi relatada por Furnus et al. (33), em contraste com os resultados obtidos no presente estudo com o meio TCM.

Todavia, o BSA possui como contaminante embriotrófico o citrato (34), atuando também como agente quelante de metais (35), podendo estar contaminado com diversos peptídeos, substratos energéticos e fatores de crescimento (36). Além disso, diferentes partidas de BSA, disponíveis comercialmente, podem inibir ou estimular o desenvolvimento embrionário (37). O BSA tem sido comumente substituído por macromoléculas sintéticas, PVA ou PVP, quando meios quimicamente definidos são desejados (38).

Assim, uma baixa competência para o desenvolvimento embrionário, quando o meio BARC foi utilizado, sugere que o mesmo não foi efetivo em promover uma completa maturação citoplasmática do oócito, implicando em menor taxa de fertilização e baixa produção de blastocistos. Tais achados podem ser decorrentes de uma ineficiente síntese de mRNAs e/ou proteínas necessárias para o metabolismo dos oócitos antes da ativação do genoma embrionário. Durante a maturação, as mitocôndrias estão sintetizando ATP para estimular a síntese proteica necessária para a maturação do oócito e, posterior, desenvolvimento do embrião (2). Este fato também foi relatado por Yurttas, Morency e Coonrod (10), os quais observaram que oócitos transcrevem e estocam uma grande quantidade de material não seletivo para a oogênese, mas, que são essenciais na regulação da embriogênese.

Seguramente, a utilização de meio quimicamente definido (MQD) na etapa da MIV seria fundamental para a identificação de componentes essenciais para o estabelecimento da maturação citoplasmática e nuclear, a qual poderia culminar com o desenvolvimento de um maior número de oócitos fertilizados e blastocistos produzidos. Porém, desde o primeiro relato de sucesso da produção de embriões bovinos em MQD (29), poucos trabalhos têm priorizado a adoção de protocolos visando a PIV de embriões nesses meios, o que torna mais difícil a elucidação de constituintes essenciais para os gametas e embriões em cultura *in vitro*.

Esses autores demonstraram a habilidade das gonadotrofinas recombinantes (r-hFSH e r-hLH) efetivamente levar à maturação funcional de oócitos bovinos, evidenciada pelo desenvolvimento embrionário comparável com o meio de MIV contendo gonadotrofinas biológicas (oFSH, NIDDK-o-FSH-17; b-LH, USDA-bLH-B-6). Entretanto, a maioria dos pesquisadores ainda trabalha com gonadotrofinas biológicas, purificadas (38-41).



Devido ao fato de o meio BARC não ter se mostrado efetivo para a MIV de oócitos bovinos, sob as condições experimentais adotadas neste estudo, investigações adicionais, com a adição de diferentes componentes quimicamente definidos ao meio BARC, devem ser realizadas na expectativa de aprimorar a MIV de oócitos bovinos, visando, assim, a obtenção de oócitos com maior competência para a FIV e maior capacidade para o desenvolvimento embrionário até os estágios de pré-implantação.

## CONCLUSÃO

O meio BARC, suplementado com diferentes concentrações de SFB, BSA ou PVA, não foi eficiente em promover adequada maturação de oócitos bovinos *in vitro*, resultando em menor taxa de fertilização e baixa produção de blastocistos, em comparação com o meio TCM.

## AGRADECIMENTOS

FAPESP (processo n°. 2011/11985-2) e frigorífico BrasFrigo, Birigui, SP.

## REFERÊNCIAS

1. Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. Normal development following in vitro fertilization in cow. *Biol Reprod.* 1982;27:47-158.
2. Krisher RL, Bavister BD. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology.* 1998;49:103-14.
3. Gilchrist RB, Albuz FK, Thompson JG. A new approach to in vitro maturation (IVM) and embryo in vitro production: induced IVM substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. *Reprod Fertil Dev.* 2010;22:293.
4. Van Blerhom J, Bell H, Weipz D. Cellular and developmental biological aspects of bovine meiotic maturation, fertilization, and preimplantation embryogenesis in vitro. *J Electron Microscop Tech.* 1990;16:298-323.
5. Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction.* 2010;139:685-95.
6. Sutton ML, Cetica PD, Beconi MT, Kind KL, Gilchrist RB, Thompson JG. Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. *Reproduction.* 2003;126:27-34.
7. Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci.* 2004;82-83:431-46.
8. Bender K, Walsh S, Evans ACO, Fair T, Brennan L. Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows. *Reproduction.* 2010;139:1047-55.

9. Gendelman M, Aroyo A, Yavin S, Roth Z. Seasonal effects on gene expression, cleavage timing and developmental competence of bovine preimplantation embryos. *Reproduction*. 2010;140:73-82.
10. Yurttas P, Morency E, Coonrod SA. Use of proteomics to identify highly abundant maternal factors that drive the egg-to-embryo transition. *Reproduction*. 2010;139:809-23.
11. Ward F, Enright B, Rizos D, Boland M, Lonergan P. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology*. 2002;57:2105-17.
12. Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard MA. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol Reprod*. 2002;66:38-43.
13. Pereira DC, Dode MAN, Rumpf R. Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*. 2005;63:1131-41.
14. Silvestre MA, Yániz J, Salvador I, Santolaria P, López-Gatius F. Vitrification of pre-pubertal ovine cumulus-oocytes complexes: effect of cytochalasin B pretreatment. *Anim Reprod Sci*. 2006;93:176-82.
15. Gonçalves RF, Chapman DA, Bertolla RP, Eder I, Killian GJ. Pre-treatment of cattle semen or oocytes with purified milk osteospondin affects in vitro fertilization and embryo development. *Anim Reprod Sci*. 2008;108:375-83.
16. Silva C, Calegari RS, Martins Jr A. Desenvolvimento de embriões bovinos após maturação in vitro de oócitos em meio de cultivo suplementado com taurina ou glicina. *Vet Zootec*. 2009;16:89-100.
17. Silva-Frade C, Martins Jr A, Borsanelli AC, Frade MC, Cardoso TC. Effects of bovine herpesvirus type 5 on development of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*. 2010;73:324-31.
18. Martins Jr A, Silva-Frade C, Borsanelli AC, Souza DG, Cardoso TC. Detection of viral DNA in bovine embryos after in vitro maturation of oocytes in herpesvirus type-5-containing medium. *Reprod Domest Anim*. 2010;45:98.
19. Makarevich AV, Markula M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. *Biol Reprod*. 2002;66:386-92.
20. Geshi M, Takenouchi N, Yamauchi N, Nagai T. Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. *Biol Reprod*. 2000;63:1730-4.
21. Olson SE, Seidel Jr GE. Reduced oxygen tension and EDTA improve bovine zygote development in a chemically defined medium. *J Anim Sci*. 2008;78:152-7.

22. Wrenzycki C, Hermann D, Keskinetepe L, M Martins Jr A, Sirissathien S, Brackett B, et al. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Hum Reprod.* 2001;16:893-901.
23. Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Imai H. Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest in vitro. *Biol Reprod.* 2002;66:1696-701.
24. Silva-Frade C, Gameiro R, Martins Jr A, Cardoso TC. Apoptotic and developmental effects of bovine Herpesvirus type 5 infection on in vitro- produced bovine embryos. *Theriogenology.* 2010;74:1296-303.
25. Gibbons J, Arat S, Rzucidlo J, Miyoshi K, Waltenburg R, Respass D, et al. Enhanced survivability of cloned derived from roscovitine-treated adult somatics cells. *Biol Reprod.* 2002;66:895-900.
26. Martins Jr A, Silva RB, Zanon JEO, Calegari RS, Verona D. Beneficial effect of bovine embryos. *Biol Reprod.* 2003;68:338-9.
27. Paschoal DM, Calegari RS, Martins Jr A. Development of bovine embryos by using penicillin-containing culture medium. *Biol Reprod.* 2006;74:126-7.
28. Ferro AC, Silva C, Calegari RS, Crespilho AM, Martins Jr A. Produção de embriões in vitro em meio de cultura com ácido ascórbico. *Vet Zootec.* 2009;16:80-8.
29. Martins Jr A, Keskinetepe L, Brackett BG. Use of recombinant gonadotrophins for embryo production in vitro. *Theriogenology.* 1998;49:292.
30. Gandhi AP, Lane M, Gardner DK, Krisher RL. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Hum Reprod.* 2000;15:395-401.
31. Watson AJ, Souza P, Caveney A, Barcroft LC, Natale D, Urquart J, et al. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biol Reprod.* 2000;62:355-64.
32. Ali A, Sirard MA. Effects of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. *Biol Reprod.* 2002;66:901-5.
33. Furnus CC, Matos DG, Picco S, García PP, Inda AM, Matiulli G, et al. Metabolic requirements associated with GSH synthesis during in vitro maturation of cattles oocytes. *Anim Reprod Sci.* 2008;109:88-99.
34. Gray CW, Morgan PM, Kane MT. Purification of an embryotrophic factor from commercial bovine serum albumin and its identification as citrate. *J Reprod Fertil.* 1992;94:471-80.
35. Chenberk S, Martell AE. Organic sequestering agents. New York: JohnWiley and Sons; 1959.

36. Kane MT. A low molecular weight extract of bovine serum albumin stimulates rabbit blastocyst cell division and expansion in vitro. *J Reprod Fertil.* 1985;73:147-50.
37. Pinyopummintr T, Bavister BD. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology.* 1994;41:1241-9.
38. Keskinetepe L, Burneley CA, Brackett BG. Production of viable bovine blastocysts in defined in vitro conditions. *Biol Reprod.* 1995;52:1410-7.
39. Keskinetepe L, Brackett BG. In vitro development competence of in vitro matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biol Reprod.* 1996;55:333-9.
40. Martins Jr A, Brackett BG. Bovine blastocyst development in chemically defined media after in vitro maturation with low concentration of recombinant human FSH. *Rev Bras Reprod Anim.* 2003;27:398-400.
41. Martins Jr A, Calegari RS, Paschoal DM, Koivisto MB, Ferro AC. Development of bovine in vitro-produced embryos after oocyte maturation with recombinant gonadotrophins and IGF 1 in chemically defined conditions. *Biol Reprod.* 2004;71:245.

**Recebido em: 29/08/2012**

**Aceito em: 08/11/2013**