

Maturação nuclear *in vitro* de ovócitos bovinos selecionados pelo método azul cresil brilhante

In vitro nuclear maturation of bovine oocytes selected by the brilliant cresyl blue method

Maduración nuclear in vitro de ovocitos bovinos seleccionados por el método azul cresil brillante

Otero A Rafael^{1*} Ph.D, Da Costa P Eduardo² Ph.D, Pereira M Emilio³ Ph.D.

¹Universidade de Sucre. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Zootecnia. Grupo de Investigación Mejoramiento y Reproducción Animal Sincelejo, Colombia.

²Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Medicina Veterinária, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

³Universidade Federal de Uberlândia, Departamento de Medicina Veterinária, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

Keywords:

Ovocytes;
Brilliant Cresyl Blue;
In vitro maturation.

Abstract

The objective was to investigate *in vitro* nuclear maturation of bovine oocytes selected by Brilliant Cresyl Blue (BCB) after maintenance in Talp-Hepes medium. Cumulus oocyte complexes (COCs) obtained from slaughterhouse ovaries were randomly assigned to 6 treatments. I. As a percentage of oocytes that presented nuclear configuration of MI (Metaphysis I) at the end of IVM, T3 and T5 were higher than T1, T2 and T4 ($p < 0.05$). As for the ability of oocytes to complete IVM, expressed by competence in reaching MII (Metaphysis II), T1, T2, and T4 treatments presented a higher percentage of MII than T3 and T5 ($p < 0.05$). Of the oocytes submitted to IVM, T1 had a lower percentage of degenerates than T2, T3, T4, T5 ($p < 0.05$). It was concluded that the ability of staining of oocytes by BCB did not change after maintenance of COCs for 5 hours in Talp-Hepes and that BCB dye showed to be effective in the selection of more competent oocytes after maintenance of COCs for 5h in Talp-Hepes.

Palavras-chave:

Ovócitos;
Azul cresil brilhante;
Maturação *in vitro*.

Resumo

Objetivou-se investigar a competência *in vitro* da maturação nuclear de ovócitos selecionados pela técnica do corante Azul Cresil Brilhante (ACB), após manutenção em meio Talp-Hepes. Complexos *cumulus* ovócito (CCOs) foram obtidos de ovários de matadouro e distribuídos aleatoriamente em 6 tratamentos. Quanto percentual de ovócitos que apresentaram configuração nuclear de MI (Metáfise I) ao término da MIV, notou-se que T3 e T5 apresentaram-se superiores ao T1, T2 e T4 ($p < 0,05$). Quanto à capacidade dos ovócitos de completarem a MIV, expresso pela competência em atingirem MII (Metáfise II), observou-se que os tratamentos T1, T2, T4 apresentaram maior percentual em MII que T3 e T5 ($p < 0,05$). Dos ovócitos submetidos a MIV, T1 apresentou menor percentual de degenerados que T2, T3, T4, T5 ($p < 0,05$). Concluiu-se que a capacidade de coloração de ovócitos por ACB não alterou após manutenção dos CCOs por 5 horas em Talp-Hepes e que o corante ACB mostrou-se eficaz na seleção de ovócitos mais competentes após manutenção de CCOs por 5h em Talp-Hepes.

INFORMACIÓN

Recibido: 21-05-2017;

Aceptado: 09-10-2017.

Correspondencia autor:

rafael.otero@unisucre.edu.co

Introdução

Na produção *in vitro* de embriões (PIVE), o advento da aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU-*Ovum Pick Up*) possibilitou a obtenção de complexos *cumulus* ovócitos (CCOs) a partir de doadoras vivas (MAPLETOFT e HASLER 2005; DENIS, 2008), fato este que impulsionou definitivamente a PIVE. Entretanto, situações como o transporte dos CCOs do local de coleta até o laboratório, assim como métodos adequados que avaliem a competência desses COCs, ainda permanecem como desafios e necessitam ser profundamente compreendidos (BLONDIN, 2017).

Meios de manutenção/transporte de COCs utilizados, assim como o pH e a temperatura destes influenciam os resultados de produção de embriões (TWAGIRAMUNGU *et al.*, 1998; SCHWARTZ *et al.*, 1998; LEIVAS *et al.*, 2004; KONRAD *et al.*, 2013). Outro fator demonstrado interferir negativamente na PIV é a baixa qualidade dos ovócitos selecionados para a maturação *in vitro* (MIV) (MACHATKOVA *et al.* 2004; DESSIE *et al.* 2007). Tal fato compromete a fertilização ou limita o desenvolvimento embrionário, principalmente durante as primeiras clivagens até a ativação do genoma embrionário (GANDOLFI e GANDOLFI, 2001).

Aspectos morfológicos de seleção de ovócitos são utilizados rotineiramente em laboratórios, na qual o número de camadas de células do *cumulus*, grau de compactação destas (MADISON *et al.*, 1992), e o aspecto do citoplasma (HAWK e WALL, 1994) são parâmetros adotados na avaliação. No entanto, o baixo percentual de ovócitos que atingem o estágio de blastocisto *in vitro*, demonstra que tal seleção visual é subjetiva, não demonstrando a real competência dos CCOs utilizados (DE LOOS *et al.*, 1992; DESSIE *et al.* 2007). Não obstante, as técnicas de seleção dos gametas competentes devem cumprir alguns pré-requisitos: serem simples e rápidas, de baixo custo e alta confiabilidade e, acima de tudo, não serem tóxicas para os ovócitos e as células somáticas que o circundam (GOOVAERTS *et al.*, 2010; BOLS *et al.*, 2012; CONZATTI, 2013).

Neste contexto, o corante Azul Cresil Brilhante (ACB) tem sido empregado amplamente como método de seleção morfológica de CCOs, na

tentativa de otimizar a seleção de ovócitos imaturos mais competentes para a PIVE, sendo descrito sua utilização com sucesso em várias espécies (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, *et al.*, 2002, 2003; PUJOL, *et al.*, 2004; ALM *et al.*, 2005; WONGSRIKEAO *et al.*, 2006; KAŹSKA-KSIAŹKIEWICZ *et al.*, 2007; MANJUNATHA *et al.*, 2007; RODRIGUEZ *et al.*, 2009; MOTA *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2013; TABANDEH *et al.*, 2012; CASTANEDA *et al.*, 2013; SU *et al.*, 2012; MIRSHAMSI *et al.*, 2013; BUDNA *et al.* 2017).

Ao longo da oogênese, RNAs e proteínas se acumulam no interior do ovócito (FAIR *et al.* 1995), como a Glicose-6 fosfato desidrogenase (G6PDH) (CETICA *et al.*, 2002). A G6PDH participa da via das pentoses fosfato no metabolismo de glicose, fornecendo NADPH (um redutor intracelular) e Ribose (substrato para a síntese de ácidos nucleicos) importantes para o crescimento celular (TIAN *et al.* 1998). A enzima G6PDH apresenta maior atividade em ovócitos em crescimento quando comparada aqueles ovócitos que atingiram seu crescimento final (MANGIA e EPSTEIN, 1975). Dada à capacidade da enzima G6PDH degradar o corante ACB e o padrão metabólico descrito, tem sido possível selecionar ovócitos imaturos bovinos mais competentes, de citoplasma azul (ACB+), daqueles, menos competentes de citoplasma incolor (ACB-) (PUJOL *et al.*, 2004; ALM *et al.*, 2005; OPIELA *et al.*, 2008; MOTA *et al.*, 2010). Ovócitos ACB+ tem demonstrado maior diâmetro (ALM *et al.*, 2005; PUJOL *et al.*, 2004), maior volume, maior número de cópias de DNAm (DNA mitocondrial) (EL SHOURBAGY *et al.*, 2006) e maiores taxas de maturação nuclear *in vitro* (ALM *et al.*, 2005; MANJUNATHA *et al.*, 2007; PRAXEDES *et al.*, 2014) que ovócitos ACB-.

Devido tais circunstâncias, o corante ACB poderia ser utilizado como uma ferramenta de auxílio à seleção de COCs depois de prolongado período de manutenção/transporte. Desta forma, tornaria possível distinguir com maior precisão aqueles ovócitos mais competentes para os sistemas de produção *in vitro* de embriões. O objetivo do trabalho foi de avaliar a competência de maturação nuclear *in vitro* de COCs bovinos imaturos selecionados por ACB, após 5h de manutenção destes em meio Talp-Hepes.

Material e métodos

Coleta e seleção dos ovócitos. Ovários de fêmeas mestiças (*Bos Taurus x Bos Indicus*) foram coletados em frigorífico imediatamente após abate dos animais. Após coleta os ovócitos foram transportados em garrafas térmicas em solução fisiológica (NaCl 0,9%) acrescida de sulfato de estreptomicina (100mg/L), em temperatura variando de 35 a 38°C em um período máximo de duas horas.

No laboratório, os folículos ovarianos de 2 a 8 mm de diâmetro foram puncionados a partir de seringas de cinco mililitros acopladas de agulha 30 x 8 (21G) e o líquido folicular contendo os ovócitos foi depositado em cálices cônicos mantidos dentro do banho-maria à 37°C. Após o período de decantação de cinco minutos, o pellet contendo ovócitos foi recuperado e transferido para uma placa de Petri.

Os ovócitos recuperados foram selecionados com auxílio de um microscópico estereoscópico (aumento 40x) e classificados morfológicamente, de acordo com COSTA et al. (1997a). Apenas os ovócitos imaturos classificados como *cumulus* compacto e com até três camadas de células do *cumulus* foram selecionados para o experimento.

Coloração por ACB. Os CCOs submetidos à coloração foram expostos por 60 minutos a solução de 26µm de ACB (B-5388, Sigma, USA) diluídos em meio Talp HEPES. A exposição dos CCOs a solução de ACB foi realizada em placas Nunc® (Nunc A/S; Cat.176740) sobre placa aquecedora à 37°C. Ao término do período de exposição os CCOs foram lavados duas vezes em meio Talp HEPES e posteriormente divididos em dois grupos de acordo com a coloração do citoplasma dos ovócitos. Ovócitos apresentando citoplasma azul foram classificados como ACB+ e aqueles demonstrando citoplasma incolor foram classificados como ACB-.

Maturação in vitro dos ovócitos. O meio de maturação *in vitro* dos ovócitos foi constituído por TCM 199 acrescido de 10% de SVE (soro de vaca em estro) e 10 µg/mL de FSH (Hormônio Folículo Estimulante). A maturação foi realizada em placas Nunc® de quatro poços, contendo aproximadamente 20 ovócitos em 400 µL de meio

de maturação em cada poço, em temperatura de 38,5°C, com 5% de CO₂, 95% de ar atmosférico e 95% de umidade em estufa incubadora. Os ovócitos foram cultivados nestas condições de temperatura e atmosfera durante 24 horas. Após este período foram submetidos à avaliação da taxa de maturação nuclear.

Delineamento experimental. Um total de 515 ovócitos imaturos foi distribuído em seis tratamentos. No T1 (testemunha) após a decantação e seleção, os ovócitos foram imediatamente submetidos ao procedimento de maturação *in vitro*, conforme descrito anteriormente. O restante dos ovócitos foram mantidos em Talp-HEPES sobre placa aquecedora a 37° em condições atmosféricas do ambiente, por dois tempos diferentes, zero e cinco horas. Ao término do período de manutenção, os CCOs foram submetidos a coloração por ACB por um período de 60 minutos. No tempo zero hora, os ovócitos foram expostos diretamente ao corante ACB. No tempo cinco horas, após o término do período de exposição, os ovócitos foram expostos durante 60 minutos ao corante ACB. Após o período de coloração organizou-se os seguintes tratamentos: corados zero hora (T2), não corados zero hora (T3), corados cinco horas (T4) e não corados cinco horas (T5). Um outro grupo (T6), os ovócitos foram mantidos em Talp-HEPES por 5 horas e submetidos imediatamente a MIV. Em seguida ovócitos de cada tratamento foram submetidos à maturação *in vitro* para posterior avaliação da taxa de maturação nuclear. Foram realizadas três repetições para cada tratamento.

Avaliação da miv. Para avaliação da taxa de maturação, os ovócitos de todos os tratamentos foram submetidos ao procedimento de remoção do *cumulus oophorus* (COSTA et al., 1997b). Posteriormente, foram hipotonizados, fixados em lâmina e corados com orceína a 2%, segundo COSTA et al. (1997c). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico, com aumento de 1.000X em imersão, para se avaliar o estágio do ciclo celular meiótico. Os ovócitos foram classificados, de acordo com a configuração dos cromossomos, em metáfase II (MII), metáfase I (MI), cromatina condensada em grumos (CCG) ou sem configuração cromossômica (SCC). Foi considerado como maturado nuclearmente os ovócitos que apresentasse configuração

cromossômica nuclear em metáfase II e, estruturas que apresentassem o primeiro corpúsculo polar. As taxas de maturação nuclear foram comparadas em tabelas de contingência e analisadas pelo teste de qui-quadrado a 5% de probabilidade (SAMPAIO, 2002).

Resultados e Discussão

Ovócitos considerados corados (ACB+) apresentaram coloração citoplasmática azul, enquanto ovócitos classificados como não corados (ACB-) apresentavam coloração de citoplasma sem a presença de alteração, como demonstrado na Figura 1.

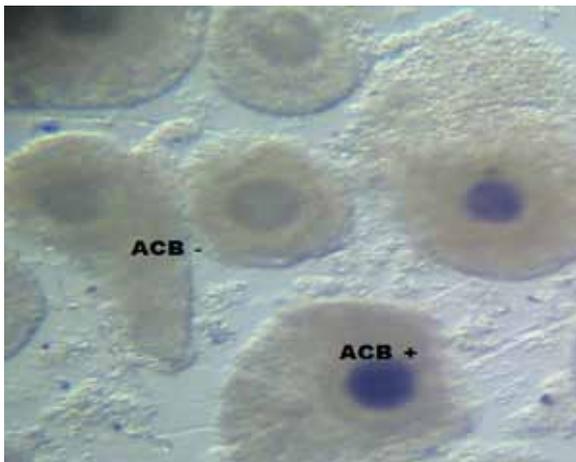


Figura 1. Demonstração dos ovócitos corados (ACB+) e não corados (ACB-) após serem expostos a 60 min ao corante Azul Crezil Brilhante (ACB). Fonte: Arquivo dos autores

Os resultados referentes às taxas de ovócitos ACB+ e ACB-, expostos ao ACB (por 60 minutos) imediatamente após seleção morfológica ou após cinco horas de manutenção em Talp Hepes, encontram-se dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 - Taxa de coloração de ovócitos expostos ao corante ACB por 60 min imediatamente após seleção morfológica ou após cinco horas de manutenção em Talp-Hepes

Grupo experimental	Número de Ovócitos	ACB+ (%)	ACB- (%)
G1	211	114(54,0) ^a	97(46,0) ^b
G2	219	129(58,9) ^a	90(41,1) ^b

Grupo 1 - Ovócitos expostos ao corante ACB logo após seleção morfológica

Grupo 2 - Ovócitos expostos ao corante ACB após período de cinco horas em Talp-Hepes

Letras iguais na mesma coluna indicam valores semelhantes ($p > 0,05$) pelo teste de qui-quadrado.

No presente trabalho a taxa de ovócitos ACB+ e ACB- quando expostos a solução de coloração por uma hora, foram semelhantes às taxas encontradas por MANJUNATHA *et al.* (2007). Estes autores, apesar de trabalharem com ovócitos de búfalas, submetem os CCOs a mesma concentração de ACB (26 μ M) diluído em mPBS e durante o período de 90min de exposição, em condições de incubação, encontrando taxas de 57% de ovócitos ACB+ e 43% de ovócitos classificados como ACB-, valores próximos aos encontrados neste trabalho. Ao testarem o corante em CCOs bovinos, aspirados de ovários de animais abatidos, ALM *et al.* (2005) e MOTA (2008) encontram taxas de 58% (ACB+); 42% (ACB-) e 60% (ACB+); 40% (ACB-), respectivamente, valores também similares aos apresentados neste experimento. Adicionalmente, BHOJWANI *et al.* (2007) buscando utilizar esta técnica para selecionar ovócitos ACB+ imaturos bovinos para a produção de embriões, pela técnica de Transferência Nuclear de Células Somáticas, obtiveram 59,4% de ovócitos ACB+ e 40,6% de ovócitos ACB-.

Diferente do presente experimento, os trabalhos até aqui citados expuseram os CCOs a solução de ACB diluído em mPBS, em estufas incubadoras sob condições de atmosfera umidificada e não sobre placa aquecedora em condições de umidade ambiental. De acordo com as taxas descritas e comparadas neste trabalho, a exposição dos CCOs ao ACB em placas Nunc[®] sobre placa aquecedora (sem controle de umidade), não comprometeu a interação entre a G6PDH e o corante, visto que, as taxas de coloração foram semelhantes. Outro fator de variação é o tempo de exposição dos ovócitos ao corante. Dentre os estudos encontrados, nota-se que MOTA (2008) manteve os CCOs por apenas 60 min, diferente de MANJUNATHA *et al.* (2007), BHOJWANI *et al.* (2007) e ALM *et al.* (2005) que incubaram por 90 min. No entanto, é possível afirmar que os 60 min de exposição dos CCOs ao ACB são suficientes para que os ovócitos mais competentes se tornem

corados de azul, possibilitando a referida seleção bioquímica.

Com relação aos ovócitos mantidos por cinco horas em Talp Hepes, simulando transporte do campo para o laboratório, e em seguida expostos ao corante, não verificou-se diferença ($p > 0,05$) nas taxas de ACB+ e ACB- quando comparadas à coloração imediatamente após seleção morfológica (Tabela 1).

Diante destes achados, sugere-se que o corante ACB foi capaz de selecionar os ovócitos mais competentes (ACB+) mesmo após longo período (5 horas) em condições de transporte simulado. Provavelmente, os níveis e/ou a atividade da G6PDH dos ovócitos em meio Talp-Hepes não alteraram ao longo das cinco horas, e uma vez que as estruturas estavam continuamente expostas ao corante à enzima foi capaz de degradar o ACB da mesma maneira de quando é exposto imediatamente.

LEIVAS *et al.* (2004) concluíram que o transporte de ovócitos em meio TCM-HEPES por períodos de até 12 horas a 39° C não determinaram decréscimo nas taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro* bem como no número de células de blastocistos eclodidos. De acordo com MONTAGNER *et al.* (2000) a adição de Hepes aos meios de maturação de ovócitos (TCM-199 modificado) e desenvolvimento embrionário (KSOM modificado) minimiza a variação de pH, diminuem a variabilidade dos resultados e incrementam os índices de blastocistos.

Dessa forma, o período de apenas cinco horas de simulação de transporte, somado as propriedades de manutenção da viabilidade do gameta proporcionadas pelo tampão Hepes, mantiveram os CCOs em condições bem semelhantes aqueles ovócitos imediatamente expostos ao ACB. A partir do exposto, pode-se afirmar que o corante ACB se mostrou eficaz na seleção de ovócitos bovinos imaturos, mesmo quando os mesmos foram submetidos a períodos prolongados de transporte simulado.

WONGSRIKEAO *et al.*, (2006) ao testarem a dupla exposição de CCOs suínos observaram que todos os ovócitos classificados como ACB+ ao início da MIV também exibiram o citoplasma

corado após exposição ao corante depois de 44h de MIV. Apesar dos autores utilizarem espécie distinta e meio de cultivo suplementado com outros fatores (objetivando a maturação nuclear *in vitro*), impossibilitando assim a comparação direta com o meio Talp Hepes, o fato dos ovócitos ACB+ continuarem classificados como ACB+ após 44h corrobora com os achados do presente experimento, de que, a taxa de ovócitos ACB+ após zero ou cinco horas em Talp Hepes continua semelhante.

Neste trabalho, foi também avaliada a capacidade de maturação *in vitro* de ovócitos a partir da seleção dos CCOs corados ou não após seleção morfológica ou após cinco horas de manutenção em Talp Hepes. Os resultados encontram-se sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2. Maturação nuclear *in vitro* de ovócitos ACB+ e ACB- selecionados após exposição imediata ao corante ou após cinco horas de manutenção em Talp Hepes.

Tratamentos	N	MI (%)	MII (%)	Degenerados (%)
T1-Controle	105	16 (15,2) ^a	82 (78,1) ^a	7 (6,7) ^a
T2- ACB+	98	5 (5,1) ^b	72 (73,5) ^a	21 (21,4) ^b
T3- ACB-	94	29 (30,9) ^c	36 (38,2) ^b	29 (30,9) ^b
T4- ACB+ (5h)	103	10 (9,7) ^{ab}	68 (66,0) ^a	25 (24,3) ^b
T5- ACB- (5h)	81	24 (29,7) ^c	30 (37,0) ^b	27 (33,3) ^b

Valores com letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferenças ($p < 0,05$) pelo teste do qui-quadrado.

Aproximadamente 70-80% dos CCOs bovinos submetidos aos sistemas de maturação *in vitro* atuais, atingem o estágio de MII da meiose (ALM *et al.*, 2005; DODE e ADONA *et al.*, 2001). De acordo com os resultados obtidos neste experimento, observa-se que a taxa de maturação nuclear de ovócitos ACB+ foi superior aqueles ACB-, independente do momento em que foram expostos ao corante. Entretanto, os ovócitos do grupo ACB+ (zero ou cinco horas) não apresentaram maior capacidade de maturação quando comparado ao grupo controle. Esses resultados corroboram os achados de ALM *et al.* (2005), os quais também obtiveram maior percentual de ovócitos ACB+ (72,5%) em MII comparado aos ovócitos ACB- (58,1%). Semelhantemente estes autores também não verificaram maior taxa de maturação

de ovócitos ACB+ quando comparado ao grupo controle. MANJUNATHA *et al.* (2007) obtiveram maior percentual de maturação *in vitro* a partir de ovócitos bubalinos ACB+ (82,6%) comparado aos classificados como ACB- (59,2%). No entanto, ovócitos ACB+ também apresentaram o mesmo percentual de maturação que o grupo controle.

O percentual de maturação nuclear *in vitro* de CCOs pode variar principalmente em função do diâmetro dos ovócitos (OTOI *et al.*, 1997; YONG *et al.*, 1997; FAIR *et al.*, 1995). CHRISTMANN *et al.*, (1994) sugeriram que ovócitos em crescimento, ainda não possuem capacidade de ativar o complexo fator promotor de mitose (MPF) devido à presença de inibidores no ooplasma do gameta. De fato, ANGUITA *et al.* (2007) observaram que ovócitos de maior diâmetro apresentaram maior atividade de MPF ao término da MIV. Além disso, FAIR *et al.* (1995) argumentaram que ovócitos bovinos apresentando diâmetro <100 µm ainda não possuem completa capacidade para transcrição e tradução de importantes mRNAs necessários para a sínteses e ativação de proteínas requeridas para o rompimento do envelope nuclear. Segundo esses autores, ovócitos bovinos adquirem completa competência meiótica quando apresentam cerca de 110µm.

Trabalhando com ovócitos de novilhas (7-11 meses), PUJOL *et al.*, (2004) verificaram que ovócitos ACB+ (incluindo a zona pelúcida) apresentam maior diâmetro médio (152,6 µm) que os ACB- (147,0 µm). Maior diâmetro de ovócitos ACB+ também já foi confirmado em porcas (ROCA *et al.* 1998) e cabras pré-puberres (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2002). Considerando que, ovócitos ACB+ apresentam menor atividade da enzima G6PDH (ALM *et al.*, 2005) tornando-se corados ao término da exposição e que apresentam em média maior diâmetro que os aqueles ACB-, verifica-se que os ACB+ apresentam maior competência para a retomada da divisão meiótica, fato este confirmado no presente experimento. O presente estudo identificou que maior número de ovócitos classificados como ACB- apresentaram a configuração nuclear de MI ao término das 24 horas de MIV, comparado ao tratamento controle e aos ovócitos ACB+. Tal resultado demonstra que ovócitos ACB- apresentam atraso e/ou incapacidade de completarem a divisão meiótica.

EL SHOURBAGY *et al.* (2006) demonstraram que ovócitos suínos ACB- apresentam menor número de cópias de DNAm^t do que os ACB+. Ainda, WU *et al.*, (2007) trabalhando com ovócitos de camundongas, observaram que ao término da MIV, os ovócitos ACB- apresentaram um padrão de distribuição mitocondrial mais difuso no citoplasma e não próximo a placa metafásica como aqueles ACB+. Tais trabalhos demonstram que a incompetência citoplasmática de ovócitos ACB- pode comprometer diretamente a maturação nuclear.

No presente estudo foi possível notar que ovócitos submetidos ao corante ACB, independente da classificação, apresentaram maiores taxas de degeneração ao término da MIV, comparado ao tratamento controle (não exposto ao corante ACB). Segundo ALM *et al.*, (2005) a exposição dos ovócitos ao ACB por 90 min não está associada à alterações na configuração das cromatinas. No trabalho supracitado verificou-se que 12,5% dos ovócitos apresentaram sinais de degeneração logo após aspiração dos folículos, e ao término dos 90 min em solução de ACB foi encontrado 15,7% de ovócitos apresentando sinais de degeneração, caracterizados por cromatina picnótica em vários estágios da meiose ou cromatina degenerada e dispersa pelo ovócito. Da mesma forma, ao avaliar os mesmos parâmetros após a MIV, ALM *et al.*(2005) observaram que 14,6% de ovócitos expostos ao ACB mostraram-se degenerados e ao passo que apenas 5,7% se apresentaram degenerados para o grupo controle (MIV logo após seleção morfológica, sem exposição ao corante). Apesar da concentração mínima para coloração de 26µM de ACB estar sendo enfatizada na maioria dos trabalhos, confirmada por MANJUNATHA *et al.*, (2007), e não apresentar efeitos deletérios ao embrião (TIFFIN *et al.*, 1991), KATSKA-KSIAZKIEWICZ *et al.* (2007) observaram que do *pool* total de CCOs de cabras expostos ao ACB, 3,6% do total apresentaram sinais de degeneração no citoplasma.

De acordo com os autores alguns ovócitos poderiam ser mais sensíveis ao ACB apresentando características apoptóticas. Outra razão que poderia justificar elevação das taxas de degeneração é o tempo de exposição a este corante em condições que não sejam totalmente propícias para a maturação do ovócito. A falta

de nutrientes essenciais para a completa maturação nuclear e citoplasmática dos ovócitos e possivelmente um reinício da meiose precoce, em razão da retirada da estrutura do ambiente folicular, poderiam representar causas prováveis de degeneração à ovócitos expostos por um tempo prolongado à soluções corantes.

Portanto, a partir do presente estudo esclareceu duas possibilidades bastante pertinentes. Primeiramente, mesmo que outros parâmetros como a competência para o desenvolvimento embrionário e a qualidade dos embriões não tenham sido analisados, verificou-se que a seleção não invasiva de CCOs via corante ACB, selecionando ovócitos de maior competência meiótica, é possível na ausência de condições atmosféricas controladas. Adicionalmente, a constatação de que os ovócitos ainda apresentam capacidade de coloração através do ACB mesmo após cinco horas em Talp Hepes, abre possibilidades para que a seleção bioquímica de CCOs possa ser empregada, mesmo após longo períodos compreendidos entre aspiração e o início dos procedimentos de cultivo *in vitro*. Neste sentido, mesmo na ausência de estufas incubadoras, os CCOs poderão ser submetidos a coloração por ACB sobre placa aquecedora ou mesmo serem submetidos ao teste de

coloração durante o transporte para o laboratório em período de 5 horas, no intuito de selecionar bioquimicamente as estruturas mais viáveis e possivelmente mais competentes.

Este estudo precursor abre inúmeras possibilidades futuras para comprovação científica da eficiência da utilização de uma classificação química para complexos *cumulus oophorus* que são utilizados no processo de PIVE de embriões bovinos. Tal fato viria de encontro à necessidade extremamente pertinente de utilização de métodos menos subjetivos e mais precisos para classificação dos gametas femininos.

Conclusões

A capacidade de coloração de ovócitos por ACB não se altera após manutenção dos mesmos por cinco horas em meio Talp-Hepes.

A competência de ovócitos ACB+ em atingir o estágio de MII é maior que ovócitos ACB-, mesmo após cinco horas de manutenção dos CCOs em meio Talp-Hepes.

Agradecimentos

À CAPES pelo apoio financeiro concedido.

Referências

- ALM, H.; TORNER, H.; LÖHRKE VIERGUTZ, GHONEIM, I.M.; KANITZ, W. 2005. Bovine blastocyst development rate *in vitro* is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology* 63:2194-2205.
- ANGUITA, B.; JIMENEZ-MACEDO, A.R.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T.; PARAMIO, M.T. 2007. Effect of oocytes diameter on meiotic competence, embryo development, p34(cdc2) expression and MPF activity in prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 67:526-536.
- BHOJWANI, S.; ALM, H.; TORNER, H.; KANITZ, W.; POEHLAND, R. 2007. Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear. *Theriogenology* 67:341-345.
- BLONDIN, P. 2017. Logistics of large scale commercial IVF embryo production. *Reproduction, Fertility and Development*, 29: 32-36
- BOLS, P.E.J.; JORSSSEN, E.P.A.; GOOVAERTS, I.G.F.; LANGBEEN, A.; LEROY, J.L.M.R. 2012. High throughput non-invasive oocyte quality assessment: the search continues. *Animal Reproduction*. 9:420-425.

- BUDNA, J.; CHACHUŁA, A.; KAŻMIERCZAK, D.; RYBSKA, M.; CIESIÓŁKA, S.; BRYJA, A.; KRANC, W.; BORYS, S.; ŻOK, A.; BUKOWSKA, D.; ANTOSIK, P.; BRUSKA, M.; BRÜSSOW, K.P.; NOWICKI, M.; ZABEL, M.; KEMPISTY, B. 2017. Morphogenesis-related gene-expression profile in porcine oocytes before and after in vitro maturation. *Zygote*. 25(3):331-340.
- CASTANEDA, C. A. et al. 2013. Lipid content, active mitochondria and brilliant cresyl blue staining in bovine oocytes. *Theriogenology*, 79 (3): 417-422. ISSN 1879-3231
- CETICA, P.; PINTOS, L.; DALVIT, G.; BECONI, M. 2002. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction* 124: 675-681.
- CHRISTMANN, L.; JUNG, T.; MOOR, R.M. 1994. MPF components and meiotic competence in growing pig oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 38:85-90.
- CONZATTI, M. 2013. Utilização do corante azul cresil brilhante como método de seleção de oócitos humanos destinados à maturação *in vitro*. *Salão de Iniciação Científica UFRGS 25:21-25* : UFRGS, Porto Alegre, RS
- COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C. et al. 1997a. Tipos morfológicos de ovócitos de bovinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo*.49:417-424.
- COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C. et al. 1997b. Técnicas para desnudamento rápido de ovócitos de bovinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo*. 49:425-432.
- COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C. et al. 1997c. Técnica para a avaliação do estágio de maturação "*in vitro*" de ovócitos bovinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 49:433-440.
- DE LOOS, F.;VAN MAURIK, P.; VAN BENEDEN, T.; KRUIP T. 1992. Structural aspects of bovine oocyte maturation in vitro. *Molecular Reproduction Developmental* 31:208-14.
- DENIS, R. 2008. Aspiración folicular in vivo (opu) una nueva perspectiva en el campo de las biotecnologías de la reproducción. *Ciencia y tecnología ganadera (cuba)*. 2 (2):57-70.
- DODE, M.A.N.; ADONA, P.R. 2001. Developmental capacity of *Bos indicus* oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6-dimethylaminopurine. *Animal Reproduction Science* 65:171-180.
- EL SHOURBAGY, S.H.; SPIKINGS, E.C.; FREITAS, M.; ST JOHN, J.C. 2006. Mitochondria directly influence fertilization outcome in pig. *Reproduction* 131: 233-45.
- FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. 1995. Bovine oocyte size in relationship to follicular diameter, maturational competence and rna synthesis. *Theriogenology* 43:209.
- GOOVAERTS, I.; LEROY J.L.; JORSSSEN, E.P.; BOLLS, P.E. 2010. Noninvasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte culture. *Theriogenology* 74(9):1509-1520. ISSN 1879-3231.
- GANDOLFI, T.A.L.B.; GANDOLFI, F. 2001. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology* 55:1255-76.
- HAWK, H.W.; WALL, R.J. 1994. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology*, 41:1571-1583.
- KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; OPIELA, J.; RYNSKA, B. 2007. Effects of oocyte quality, semen donor and embryo co-culture system on the efficiency of blastocyst production in goats. *Theriogenology* 68: 736-744.

KONRAD, J.L.; SCIAN, R.; GARRIDO, M.J.; TAMINELLI, G.; SANSINENA, M. 2013. Producción de embriones de búfalo por fertilización in vitro luego de la maduración de los ovocitos durante el transporte prolongado. *Revista Veterinaria*, 24(2): 97-101.

LEIVAS, F.G.; BRUM, D.S.; MEZZALIRA, A.; PILLA, L.F.C.; BERNARDI, M.L.; RUBIN, M.I.B.; SILVA, C.A.M. 2004. Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação sem controle de atmosfera gasosa. *Ciência Rural* 34:219-224.

MACHATKOVA, M.; KRAUSOVA, K.; JOKESOVA, E.; TOMANEK, M. 2004. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology* 61:329-35.

MADISON, V.; AVERY, B.; GREVE, T. 1992. Selection of immature bovine oocytes for developmental potential in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 27:1-11.

MANGIA, F.; EPSTEIN, C.J. 1975. Biochemical studies of growing mouse oocytes: Preparation of oocytes and analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase activities. *Developmental Biology*, 45:211-220.

MANJUNATHA, B. et al. 2007. Selection of developmentally competent buffalo oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM. *Theriogenology* 68(9):1299-304. ISSN 0093-691X.

MAPLETOFT, R.J.; HASLER, J.F. 2005. Assisted reproductive Technologies in cattle: a review. *Revue Scientifique et Technique* 24, 393–403.

MIRSHAMSI, S.M. et al. 2013. Combination of oocyte and zygote selection by brilliant cresyl blue (BCB) test enhanced prediction of developmental potential to the blastocyst in cattle. *Anim Reprod Sci*, 136(4):245-51, ISSN 1873-2232.

MONTAGNER, M.M.; GONÇALVES, P.B.D.; NEVES, J.P.; COSTA, L.F.S.; BORTOLOTTI, E.B.; FARIAS, A.M.; STRANIERI, P. 2000. Hefes na produção de embriões bovinos in vitro. *Ciência Rural* 30:469-474.

MOTA, G.B. Desenvolvimento e expressão gênica em oócitos bovinos imaturos selecionados por Azul Cresil Brilhante. 2008. Departamento de Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG. 47p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia, área de concentração em Reprodução Animal).

MOTA, G. et al. 2010. Developmental competence and expression of the MATER and ZAR1 genes in immature bovine oocytes selected by brilliant cresyl blue. *Zygote* 18(3):209-16. ISSN 1469-8730.

OPIELA, J.; KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; LIPIŃSKI, D.; SŁOMSKI, R.; BZOWSKA, M.; RYŃSKA, B. 2008. Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax, and developmental competence following IVP in cattle. *Theriogenology* 69(5):546-55.

OTOI, T.; YAMAMOTOL, K.; KOYAMA, N.; TACHIKAWA, S.; SUZUKI, T. 1997. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology*, 48:769-774.

PEREIRA, G. R. et al. 2013. Selection of developmentally competent immature equine oocytes with brilliant cresyl blue stain prior to in vitro maturation with equine growth hormone. *Zygote*, p. 1-5, Feb. ISSN 1469-8730.

PRAXEDES, E.A.; DE LIMA, J.M.P.; DE OLIVEIRA, L.O.A.; DOS SANTOS, F.A.; PEREIRA, A.F.; BEZERRA, M.B. 2014. Aspição folicular em ovários bovinos da região semiárida: tempo de transporte x qualidade oocitária. *Acta Veterinaria Brasilica*, 8:85-86.

- PUJOL, M.; LOPEZ-BEJAR, M.; PARAMIO, M. 2004. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology* 61(4):735-44.
- ROCA, J.; MARTINEZ,E.; VAZQUEZ, J.M.; LUCAS,X. 1998. Selection of immature pig oocytes for homologous in vitro penetration assays with the brilliant cresyl blue test. *Reproduction Fertility Development* 10:479-485.
- RODRIGUEZ-GONZALEZ, E. et al. 2002. Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology* 57(5):1397-409. ISSN 0093-691X.
- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, E. et al. 2003 Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue and matured with cysteamine supplementation. *Reprod Nutr Dev* 43 (2):179- 87. ISSN 0926-5287.
- RODRIGUES, B. et al. 2009 Preliminary Study in Immature Canine Oocytes Stained with Brilliant Cresyl Blue and Obtained From Bitches with Low and High Progesterone Serum Profiles. *Reproduction in Domestic Animals* 44 (2):255-258. ISSN 0936-6768.
- SAMPAIO, I.B.M. 2002. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. Belo Horizonte, Brasil.
- SCHWARTZ, J.; SCHNEIDER, M.R.; RODRIGUES, J.L.; REICHENBACH, H. D. 1998. Effect of short-term storage of bovine oocytes in different media and temperatures on the subsequent in vitro embryo development. *Theriogenology* 49:217.
- SU, J. et al. 2012. Oocytes selected using BCB staining enhance nuclear reprogramming and the in vivo development of SCNT embryos in cattle. *PLoS One* 7 (4):36181. ISSN 1932-6203.
- TABANDEH M.R.; GOLESTANI N.; KAFI M.; HOSSEINI A.; SAEB M.; SARKOOHI P. 2012. Gene expression pattern of adiponectin and adiponectin receptors in dominant and atretic follicles and oocytes screened based on brilliant cresyl blue staining. *Anim Reprod Sci.* 131(1-2):30-40.
- TIAN, W.N.; BRAUNSTEIN, L.D.; PANG, J.; STUHLMEIER, K.M.; XI, Q.C.; TIAN, X., STANTON, R.C. 1998. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *J Biol Chem* 273(17):10609-17.
- TIFFIN, G.J.; RIEGER,D.; BETTERIDGE, K.J.; YADAV B.R.; KING, W.A. 1991. Glucose and glutamine metabolism in pre-attachment cattle embryos in relation to sex and stage of development. *J. Reprod. Fert.* 93:25-32.
- TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; GUILBAULT, L.A.; SIRARD, M.A.; BOUSQUET, D. 1998. Media and time of oocytes transport influence their developmental competence for in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, 49:299.
- YONG, H. Y.; LEE, B. C.; HWANG, W. S. 1997. Effect of oocyte diameter on *in vitro* nuclear maturation of Korean native cattle oocyte. *Theriogenology* 47:205.
- WONGSRIKEAO, P; OTOI , T; YAMASAKI , H; AGUNG, B; TANIGUCHI, M; NAOI, H; SHIMIZU, R; NAGAI, T. 2006.Effects of single and double exposure to brilliant cresyl blue on the selection of porcine oocytes for in vitro production of embryos. *Theriogenology* 66:366–372.
- WU, Y.G.; LIU, Y.; ZHOU, P.; LAN, G.C.; HAN, D.; MIAO, D.Q.; TAN, J.H. 2007. Selection of oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining: a study using the mouse model. *Cell Res.* 17:722-31.