



Maturação *in vitro* de oócitos bubalinos e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário

In vitro maturation of buffaloes oocytes and its effect on embryonic development

Emílio César Martins Pereira^{1,3}, Alan Maia Borges², Eunice Oba¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

²Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

³Correspondência: emiliovet2004@yahoo.com.br

Resumo

As biotécnicas da reprodução representam uma alternativa promissora para incremento genético em curto espaço de tempo nos animais domésticos e, em bubalinos, ganham maior notoriedade devido a ocorrência de entraves reprodutivos, como manifestação discreta do estro e longo anestro pós-parto. Assim, a produção de embriões *in vitro* (PIVE) em bubalinos vem gradativamente ganhando mercado, apesar dos resultados inconsistentes e inferiores quando comparado aos bovinos. Diante disso, o entendimento das etapas da PIVE, que inclui a maturação *in vitro* dos oócitos (MIV), a fertilização *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV) se faz necessário para melhor compreensão das mudanças e necessidades durante o crescimento e desenvolvimento do oócito e do embrião. Especificamente durante a MIV ocorrem inúmeras mudanças nos oócitos que irão interferir na sua capacidade de se tornar um embrião e a seleção dos oócitos mais viáveis e competentes pode incrementar significativamente as taxas de PIVE em bubalinos. Assim, métodos de avaliação precisos e confiáveis e o conhecimento profundo da cinética de desenvolvimento dos oócitos e embriões bubalinos são necessários para o estabelecimento de protocolos e meios específicos para estes, uma vez que, que na maioria das vezes os utilizados são extrapolados da espécie bovina.

Palavras-chave: maturação oocitária, competência oocitária, PIVE, búfalo.

Abstract

The reproduction biotechnologies represent a promising alternative for genetic increase in short time in domestic animals. On buffaloes the gain are greater due to the occurrence of reproductive barriers such as discrete manifestation of estrus and long anoestrus postpartum. Thus, in vitro embryo production (IVEP) in buffaloes is gradually gaining market share despite inconsistent and inferior results when compared to cattle. Thus, the understanding of the stages of IVEP, which includes the in vitro maturation of oocytes (IVM), in vitro fertilization (IVF) and in vitro culture (IVC) is needed to better understand the changes and needs during growth and development of the oocyte and embryo. Specifically during IVM occur numerous changes in oocytes that will interfere with your ability to turn an embryo and the selection of the most viable and reliable oocytes can significantly increase PIVE rates in buffalo. Thus, accurate assessment and safe methods and a deep knowledge of the buffalo oocytes and embryos development kinetics are needed to establish protocols and specific means to them, since most that are used are extrapolated bovine species.

Keywords: oocyte maturation, oocyte competence, IVEP, Buffalo.

Introdução

Assim como em outras espécies, a aplicação de biotecnologias da reprodução em bubalinos representa uma alternativa viável para multiplicação de material de alto mérito genético em reduzido espaço de tempo. Em búfalos são descritos entraves reprodutivos em razão de características fisiológicas destes animais, que inclui a manifestação discreta dos sinais de estro, puberdade tardia, longo anestro pós-parto e baixas taxas de concepção, comprometendo a eficiência reprodutiva e limitando a produtividade destes animais (Nandi et al., 2002; Drost, 2007; Khaki et al., 2014). Diante disso, as biotecnias reprodutivas surgem como alternativas para correção destas falhas reprodutivas observadas nestes animais.

Dentre as biotecnologias reprodutivas, a PIVE ganha relevância, visto que a transferência de embriões *in vivo* (TE) a partir de programas de superovulação (SOV) não são eficientes em bubalinos. Acredita-se que a ineficiência da TE em bubalinos esteja ligada a falhas nos protocolos de superovulação a base de FSH, devido à baixa população de folículos recrutáveis (Drost, 2007), e falhas na captação dos oócitos pelas fimbrias do infundíbulo na superfície ovariana (Misra et al., 1998; Carvalho et al., 2011). Além disso, a PIVE representa excelente fonte para pesquisa e aplicação comercial, já que, é parte integrante de outras biotecnologias em desenvolvimento como a clonagem, transgenia, sexagem de embriões, injeção espermática e produção de células tronco embrionárias (Nandi et al., 2002; Elamaram et al., 2012). Diante disso, a consolidação da PIVE não só



beneficiária indiretamente outros procedimentos envolvidos como representaria uma alternativa comercial para produção de embriões bubalinos em larga escala.

Embora a PIVE em bubalinos tenha sido realizada com sucesso, apresentando taxas de MIV, FIV e clivagem satisfatórias, e inclusive com relato de nascimento de animais clonados, as taxas de produção de blastocistos e nascidos após a transferência de embriões ainda são baixas (Liang et al., 2008; Anand et al., 2008) quando comparado a bovinos. Tal fato representa ainda uma limitação para utilização desta biotecnologia em larga escala.

Condições subótimas de cultivo (Elmaram et al., 2012) e qualidade intrínseca dos oócitos (Nandi et al., 2002) têm sido as principais razões apontadas por autores para justificar as baixas taxas encontradas em búfalos. Além disso, ao considerar as diferenças estruturais e da cinética do desenvolvimento dos oócitos e embriões intrínsecas da espécie, sugere-se que o emprego das mesmas condições para produção *in vitro* de embriões de bovinos pode comprometer o sucesso de aplicação desta biotécnica em bubalinos, visto que rotineiramente grande parte dos protocolos e meios adotados para bubalinos são extrapolados da espécie bovina. Diante deste cenário, a necessidade de desenvolvimento de meios de maturação e sistemas de cultivo mais eficientes para melhoria da produção embrionária se torna cada vez mais pertinente. Por conseguinte, a suplementação dos meios com diferentes substâncias, como fatores de crescimento e antioxidantes, tem se tornado objeto de estudo de diversos pesquisadores (Nandi et al., 2003; Purohit et al., 2005; Anand et al., 2008; Singhal et al., 2009; Rocha-Frigoni et al., 2016).

Diante do pressuposto, objetiva-se neste trabalho apresentar modificações que ocorrem durante a maturação tanto nuclear quanto citoplasmática, aquisição de competência do oócito assim como variações do tempo de maturação *in vitro* de oócitos bubalinos, bem como as perspectivas futuras sobre o tema.

Maturação oocitária

Durante o procedimento de PIVE, a maturação *in vitro* dos oócitos representa uma das etapas mais desafiadoras, uma vez que durante esta fase os oócitos adquirem a capacidade intrínseca para sustentar os estágios subsequentes de desenvolvimento. Desta forma, condições ideais durante esta fase irão determinar o sucesso na fertilização e a subsequente divisão embrionária, até a ativação do genoma embrionário que finalmente proporcionará a formação dos blastocistos e o estabelecimento da gestação (Ferreira et al., 2009; Somfai et al., 2011). A MIV é essencial para que oócitos atinjam a maturação e aquisição da competência necessária para divisão embrionária e formação dos blastocistos (Lonergan et al., 2003; Somfai et al., 2011). Assim, quando realizada em condições subótimas, a MIV poderá resultar em alterações irreversíveis na expressão gênica normal, afetando drasticamente o destino do desenvolvimento dos embriões produzidos *in vitro* (Watson et al., 2000; Jones et al., 2008).

A maturação oocitária compreende uma série de eventos, tanto nucleares quanto citoplasmáticos, que irão preparar o oócito para próxima etapa que é a fecundação (Gottardi e Mingoti, 2009). A maturação nuclear envolve a progressão do oócito desde o primeiro bloqueio meiótico na Prófase I até o estágio de metáfase II (MII) ocorrendo durante esta progressão a quebra da vesícula germinativa (*vesicle germinal break down – VGBD*), condensação dos cromossomos, extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico (Sirard et al., 2001). Similarmente estas alterações ocorrem *in vivo* após o pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH).

Já a maturação citoplasmática é um procedimento mais complexo e envolve várias alterações simultâneas que incluem a síntese de proteínas intracelulares (Edwards et al., 1997), aumento da glutatona intracitoplasmática (Payton et al., 2003a), redistribuição dos grânulos corticais (Payton et al., 2003b), reorganização dos microtúbulos (Kim, 2000) e migração e redistribuição das organelas dentro do citoplasma (Anguitta et al., 2008).

Maturação Nuclear

O processo de maturação nuclear diz respeito a todos os eventos nucleares relacionados à progressão do oócito desde a prófase da primeira meiose (Prófase I) até a Metáfase II (MII), da segunda divisão meiótica. Todas estas etapas são reguladas por fatores presentes no fluido folicular, pela interação dos oócitos com as células foliculares e por fatores endócrinos, como as gonadotrofinas (Kim et al., 2008).

Inicialmente o oócito encontra-se retido no ambiente folicular em diplóteno da Prófase I, caracterizado pela presença da vesícula germinativa (VG) que é mantida pelas altas concentrações de AMPc produzido pelas células da granulosa e transportado para o oócito através das junções *gap* (Van der Hurk e Zao, 2005). *In vivo* a elevação dos níveis de LH provoca uma súbita queda dos níveis de AMPc, seja pelo desacoplamento das junções *gap* entre oócitos e células da granulosa ou pela redução da síntese do próprio AMPc por estas células (Kawamura et al., 2004). Esta ação do LH é mediada pelo fator de crescimento epidermal (EGF), secretado pelas células murais da granulosa. Consequentemente, o declínio do AMPc provoca uma desfosforilação e ativação do complexo fator promotor da maturação/meiose (MPF), que por sua vez está envolvido em vários eventos



nucleares e citoplasmáticos relacionados à maturação oocitária (Millar e Russell, 1992). *In vitro*, o restabelecimento da meiose se dá imediatamente após a retirada do oócito de dentro do ambiente folicular em decorrência da perda de contato entre o oócito e as células da granulosa (Tomas et al., 2004).

As alterações nucleares nesta fase incluem a condensação dos cromossomos, o desaparecimento do nucléolo, a desintegração da membrana celular (carioteca) e do rompimento do envelope nuclear, caracterizando a VGBD. Em seguida, o oócito passa pelo estágio de diacinese, seguindo na Metáfase I (MI), Anáfase I (AI) e Telófase (TI) e completando a primeira divisão meiótica. Na sequência, ocorre uma divisão assimétrica do citoplasma, originando uma célula menor, o corpúsculo polar, e outra maior, o oócito secundário (Can et al., 2003). Os cromossomos homólogos então se separam em dois grupos, sendo que a metade do número original de cromossomos permanece alinhados no centro do fuso do oócito (célula haplóide) e a outra metade é incorporada ao corpúsculo polar (Gotardi e Mingoti, 2009). Estes eventos caracterizam o estágio de metáfase II (Sirard et al., 1992) e a partir daí a meiose é prontamente interrompida, em um estágio denominado segundo bloqueio meiótico. O reinício da meiose poderá ocorrer em decorrência da fecundação do espermatozóide ou por ativação partenogênica (Gordon, 1994).

Maturação Citoplasmática

Simultaneamente a maturação nuclear, o citoplasma dos oócitos necessita sofrer modificações que proporcionem a esta célula competência suficiente para garantir o sucesso na fecundação e no subsequente desenvolvimento embrionário. Assim, para a completa maturação do oócito é necessário que ocorra eventos intracelulares que incluem a redistribuição das organelas citoplasmáticas, estocagem de mRNA (RNA mensageiro), síntese de proteínas e fatores de transcrição (Ferreira et al., 2009; Fu et al., 2016). Embora sejam processos distintos, a maturação nuclear e citoplasmática são eventos que ocorrem simultaneamente, apesar da programação molecular do citoplasma ter início ainda na fase de crescimento do oócito.

Modificações ultraestruturais que ocorrem no oócito durante a maturação citoplasmática são necessárias para o bloqueio da poliespermia, para descondensar o núcleo do espermatozóide e formar o pró-núcleo masculino pós fecundação e sobretudo, para garantir o estoque de transcritos e proteínas do citoplasma do oócito na fase inicial de desenvolvimento embrionário até o estágio de oito/dezesseis células (Picton et al., 1998; Ferreira et al., 2008). Após esta fase, o genoma embrionário é ativado, e a síntese de novas proteínas passa ser oriunda dos transcritos embrionários ao invés dos transcritos maternos, denominado de transição materno zigótica (TMZ) (Stitzel e Seydoux, 2007). Portanto, para garantir o sucesso do desenvolvimento embrionário é fundamental que todos eventos da maturação citoplasmática sejam realizados com excelência.

Em bubalinos, constatou-se ultra estruturalmente que ocorre migração dos *clusters* mitocondriais, do retículo endoplasmático liso e rugoso e do complexo de Golgi para região periférica do oócito conforme o avançar da maturação (Mondadori et al., 2010a; Mondadori et al., 2010b), diferentemente do que ocorre em bovinos (Ferreira et al., 2009). Além disso, evidenciou em bubalinos a multiplicação e migração periférica dos grânulos corticais, alteração no aspecto morfológico da população de gotículas de lipídeos no ooplasma, aumento do espaço perivitelino perinuclear e redução gradativa do contato entre as células do *cumulus* e o oócito conforme a maturação *in vitro* dos oócitos bubalinos evoluiu (Mondadori et al. 2010b).

Competência oocitária

A competência oocitária pode ser entendida como a capacidade do oócito de concluir todas as etapas da maturação nuclear e citoplasmática, ser fecundado, completar o desenvolvimento embrionário e dar origem ao feto (Ferreira et al., 2009). Essa competência é adquirida ao longo do crescimento dos oócitos e está relacionada com as modificações nucleares e citoplasmáticas que ocorrem durante a fase final de desenvolvimento folicular e na maturação. Acredita-se que a capacidade de processamento e estocagem de RNA e proteínas durante o crescimento e maturação estejam diretamente relacionados com a aquisição de competência dos oócitos (Caixeta et al., 2013). Assim, para que o oócito se torne competente o mesmo deverá ter completado toda sua fase de crescimento, que ocorre quando o oócito alcança 120µm em bovinos (Makita et al., 2016) e 145 µm em bubalinos (Nandi et al., 2002).

É possível estabelecer uma correlação *in vivo* entre o tamanho do foliculo e a competência dos oócitos de bubalinos (Yousaf e Chohan, 2003). Em avaliações realizadas *in vitro*, associa-se a aquisição da competência com o padrão de metilação (Fagundes et al., 2011) e a formação de estoque de RNA suficiente para produzir proteínas e manter a sobrevivência do oócito durante sua maturação e desenvolvimento embrionário inicial, até que o genoma embrionário seja ativado. O desenvolvimento de mecanismos reguladores de cálcio, alterações na atividade do MPF e da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e a redistribuição de organelas citoplasmáticas são eventos que estão ligados à aquisição de competência nos oócitos (Anguita et al., 2008).

A aquisição da competência oocitária em bubalinos pode ser influenciada por fatores tanto ambientais, como efeito da estação do ano e variações térmicas (Nandi et al., 2001; Khairy et al., 2007; Di Francesco et al., 2011; El-Naby et al., 2013), quanto inerentes ao próprio oócito. Estes fatores incluem a presença de corpo lúteo



nos ovários, tamanho do folículo, frequência de aspiração *in vivo*, número de camadas de células do *cumulus*, maturação *in vitro* ou *in vivo* e origem dos oócitos (Singh et al., 2001; Yousaf e Chohan, 2003; Yindee et al., 2011; Sharma et al., 2012; El-Naby et al., 2013).

Em relação à temperatura ambiental, esta parece exercer efeito deletério sobre a quantidade e qualidade dos folículos disponíveis para aspiração. Estudos demonstraram que estações quentes reduzem a quantidade de folículos antrais disponíveis (Abdoon et al., 2014) e a qualidade dos oócitos recuperados das búfalas (El-Naby et al., 2013; Abdoon et al., 2014). Desta forma, acredita-se que a elevação da temperatura ambiental influencie na competência de desenvolvimento dos mesmos, refletindo diretamente na taxa de maturação (Nandi et al., 2001; Khairy et al., 2007) e na taxa de clivagem e produção de blastocistos (Di Francesco et al., 2011; Abdoon et al., 2014).

A competência do oócito de bubalinos está diretamente ligada ao estado morfofuncional dos ovários. A aquisição de competência destes animais encontra-se dependente do tamanho do folículo da qual é obtido. Folículos maiores que 4mm são considerados em bubalinos ideais para obtenção de melhores resultados na produção *in vitro* de embriões (Yousaf e Chohan, 2003). A frequência da OPU também pode influenciar, uma vez que, oócitos obtidos a partir de seções de OPU duas vezes por semana possuem maior competência do que oócitos coletados semanalmente (Yindee et al., 2011).

A fonte de obtenção dos oócitos em bubalinos é outro fator capaz de influenciar a aquisição da competência. Tendo em vista a origem do oócito, constatou-se que quando coletados de ovários de frigorífico os ovários possuem menor capacidade de se tornar um blastocisto do que quando coletados através da OPU (Neglia et al., 2003). Acredita-se que consecutivas aspirações acabam resultando em aumento da frequência das ondas foliculares, proporcionando obtenção de oócitos mais competentes (Boni et al., 1996). Possivelmente, por ser tratar de animais oriundo de descarte de rebanhos de produção de leite, o estado corporal e o nível de estresse destes animais constituem uma outra justificativa para este fato. Ainda sim, Yindee et al. (2011) confirmaram não haver influência do estado reprodutivo dos animais (gestante ou não gestantes) na competência de desenvolvimento dos oócitos coletados. Comparando a maturação ocorrida dentro do ambiente folicular (*in vivo*) ou fora dele (*in vitro*), conclui-se que apesar de possuírem taxas semelhantes de maturação e clivagem, oócitos que completam a maturação *in vitro* refletem em menores taxas de produção de mórulas e blastocistos do que quando maturados *in vivo* (Sharma et al., 2012), diferentemente do que ocorre em bovinos (Makita et al., 2016).

Resultados relacionando a competência dos oócitos e a presença do corpo lúteo (CL) são ainda bem contraditórios em bubalinos. A presença de CL no ovário parece provocar a diminuição do número médio de oócitos disponíveis nos ovários de búfalas e da taxa de recuperação de oócitos de boa qualidade nestes ovários (Amer et al., 2008). El-Naby et al. (2013) constataram um aumento significativo na taxa de maturação de oócitos obtidos a partir de ovários que não possuíam CL. Por outro lado, foi evidenciado que as taxas de clivagem e de produção de embriões foram superiores em ovários com presença de CL e sem a presença de folículo dominante (Manjunatha et al., 2007). Além disso, oócitos com camadas de células do *cumulus* intactas (>3 camadas) apresentaram maiores taxas de MIV do que oócitos sem células do *cumulus* (Amer et al., 2008). Este autor sugere que o co-cultivo de oócitos de pobre qualidade com células do *cumulus* representa uma alternativa para promover o aumento da competência oocitária.

O sucesso da PIVE está intimamente relacionado à qualidade do oócito e a capacidade do meio de maturação em fornecer a ele as condições necessárias para seu desenvolvimento. Portanto, a fim de determinar a eficiência do meio de MIV é fundamental uma avaliação rápida e confiável, tanto de oócitos imaturos, previamente a MIV, quanto do grau de maturação destes após esta etapa. No entanto, a avaliação morfológica, baseada no número de camadas, compactação das células do *cumulus* e homogeneidade do ooplasma, não são fidedignas suficiente para atuar como critério único para determinação da competência oocitária (Bhardwaj et al., 2016). Além dos mais, métodos para uma avaliação mais segura, grande parte das vezes são invasivos ao ponto de danificar e/ou matar a célula. Diante disso, permanece o desafio de desenvolvimento de técnicas que avaliarem de forma rápida o estágio de maturação dos oócitos sem subestimar a taxa de maturação real (Nandi et al., 2002).

Tempo de Maturação de oócitos bubalinos

Entre os inúmeros fatores que afetam o desenvolvimento do embrião bubalino *in vitro*, a duração da MIV merece destaque, uma vez que, o tempo inapropriado de maturação pode levar a anormalidades nos cromossomos (Neglia et al., 2001), envelhecimento dos oócitos (Hunter e Greve, 1997) e redução das taxas de clivagem e blastocisto (Gasparrini et al., 2008).

Ao fazer uma comparação cronológica dos eventos condizentes com a maturação nuclear, pôde-se constatar que a maturação de oócitos de búfalas *in vitro* ocorre mais rápida que a de oócitos bovinos (Neglia et al., 2001) (Tabela 1).

Tabela 1. Cinética da maturação nuclear *in vitro* em bovinos e bubalinos.

Evento	Duração	Espécie	Referência
Quebra da vesícula germinativa (VGBD)	Até 10 horas	Bubalinos	Neglia et al., 2001
	Até 06 horas	Bubalinos	Gasparrini et al., 2008
	Até 15 horas	Bovinos	Neglia et al., 2001
	6,6 a 8 horas	Bovinos	Sirard et al., 1989
1ª divisão meiótica	10 a 14 horas	Bubalinos	Neglia et al., 2001
	09 a 12 horas	Bubalinos	Gasparrini et al., 2008
	15 a 18 horas	Bovinos	Neglia et al., 2001
	10,3 a 15,4 horas	Bovinos	Sirard et al., 1989
2ª divisão meiótica	15 a 16 horas	Bubalinos	Neglia et al., 2001
	18 a 21 horas	Bubalinos	Gasparrini et al., 2008
	18 a 24 horas	Bovinos	Neglia et al., 2001
	18 a 24 horas	Bovinos	Sirard et al., 1989

Embora seja evidente a variação dos tempos de maturação reportada entre bubalinos, alta proporção do oócito atinge a MII no período de 15-21 horas, portanto, mais rápida quando comparada a bovinos. As variações nos tempos de maturação de bubalinos ocorrem, sobretudo, pelas diferenças nas condições da MIV ou pela qualidade inerente aos próprios oócitos, que nesta espécie é também afetada pela sazonalidade (Gasparrini, 2007). Além disso, no período de 20-24 horas de MIV foi observado um aumento significativo na extrusão completa dos cromossomos nos oócitos bubalinos, fato não observado em bovinos (Neglia et al., 2001). Este fato pode sugerir que a extensão do tempo de MIV em búfalos poderia implicar na redução do desenvolvimento embrionário.

No entanto, a maioria dos protocolos de PIV em búfalos recomenda a inseminação dos oócitos 24 horas após o início da MIV, seguindo o parâmetro realizado em bovinos. Diante disso, o tempo da fertilização dos oócitos em bubalinos deveria ser revisto no intuito de estabelecer esta prática um pouco mais precoce, às 18 horas pós MIV ao invés de 24 horas, já que o atraso da FIV nestas espécies tem significativo comprometimento no desenvolvimento embrionário (Gasparrini et al., 2008).

Perspectivas futuras

A quantificação da expressão gênica e análise proteômica dos oócitos durante a maturação *in vitro*, como recentemente realizada em bovinos (Adona et al., 2016) e bubalinos (Fu et al., 2016), mostram ser um caminho para identificar os principais genes e proteínas regulatórios relacionados a maturação *in vitro* dos oócitos, definindo assim biomarcadores da competência oocitária. Recentemente em bubalinos, buscou-se estabelecer uma correlação entre a coloração azul cresil brilhante (ACB) das células do COCs, a expressão de genes marcadores nestas células e a subsequentemente produção de embriões *in vitro* (Bhardwaj et al., 2016). Neste estudo, os autores puderam identificar os oócitos mais competentes e definir, para a espécie bubalina, genes que determinam a maior competência oocitária. Métodos rápidos e precisos como estes parecem ser o caminho para identificação e seleção de oócitos que seguramente possuem maior habilidade de desenvolvimento.

Considerações finais

Embora nos últimos anos tenha sido obtido sucesso na produção *in vitro* de embriões de bubalinos, os resultados ainda são bem inconsistentes e inferiores a produção *in vitro* obtida em bovinos. A extrapolação da maioria dos protocolos utilizados rotineiramente em bovinos para bubalinos consiste um empecilho para que se tenha melhores resultados de PIVE em búfalos. A diferença entre as espécies é considerável e precisa ser respeitada durante o processo de produção *in vitro* de embriões.

Diante disso, se torna essencial o estudo aprofundado das diversas etapas envolvidas na produção de embriões em búfalos, desde a recuperação dos oócitos até o cultivo *in vitro*, passando pela maturação e fertilização *in vitro*. Para isso se faz necessário o aperfeiçoamento de métodos para avaliação da maturação, sobretudo a citoplasmática, tanto de oócitos imaturos quanto maduros, para que sejam selecionados os oócitos mais competentes e comprove a eficiência dos meios MIV utilizados. O desenvolvimento de metodologia moleculares mais recentes, como análise proteômica e quantificação da expressão gênica, se mostram como alternativas potenciais para determinação da competência oocitária. Acredita-se que a partir disso, poderão ser adotados protocolos e sistemas específicos para a PIVE em bubalinos, proporcionando melhores resultados e viabilizando a produção de embriões em larga escala.

Assim, mesmo que existam limitações inerentes à espécie para estudo da produção *in vitro* de embriões, como a baixa taxa de recuperação dos oócitos, baixa frequência de abate de animais nos frigoríficos e a sazonalidade reprodutiva, a compreensão das modificações celulares e necessidades dos embriões bubalinos



durante seu desenvolvimento *in vitro* é fundamental para obtenção de melhores resultados.

Referências

- Abdoon AS, Gabler C, Holder C, Kandil OM, Einspanier R.** Seasonal variations in developmental competence and relative abundance of gene transcripts in buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *Theriogenology*, v.82, p.1055-1067, 2014.
- Amer HA, Hegab AO, Zaabal SM.** Effects of ovarian morphology on oocyte quantity and quality, granulosa cells, *in vitro* maturation, and steroid hormone production in buffaloes. *Anim Reprod*, v.5, p.55-62, 2008.
- Adona PR, Leal CLV, Biase FH, De Bem TH, Mesquita LG, Meirelles FV, Ferraz AL, Furlan LR, Monzani OS, Guemra S.** *In vitro* maturation alters gene expression. In bovine oocyte. *Zygote*, v.24, p.624-633, 2016.
- Anguita B, Paramio MT, Jimenez-Macedo AR, Morató R, Mogas T, Izquierdo D.** Total RNA and protein content, Cyclin B1 expression and developmental competence of prepubertal goat oocytes. *Anim Reprod Sci*, v.103, p.290-303, 2008.
- Anand T, Kumar D, Chauhan MS, Manik RS, Palta P.** Cysteamine supplementation of *in vitro* maturation medium, *in vitro* culture medium or both media promotes *in vitro* development of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Reprod Fertil Dev*, v.20, p.253-257, 2008.
- Bhardwaj R, Ansari MM, Pandey S, Parmar MS, Chandra V, Kumar GS, Sharma GT.** GREM1, EGFR, and HAS2; the oocyte competence markers for improved buffalo embryo production *in vitro*. *Theriogenology*, v.86, p.2004-2011, 2016.
- Boni R, Roviello S, Zicarelli L.** Repeated ovum pick up in Italian Mediterranean buffalo cows. *Theriogenology*, v.46, p.899-909, 1996.
- Can A, Semiz O, Cinar O.** Centrosome and microtubule dynamics during early stages of meiosis in mouse oocytes. *Mol Hum Reprod*, v.9, p.749-756, 2003.
- Caixeta ES, Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG, Price CA, Machado MF, Lima PF, Buratini J.** Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake, and expression of genes in the ovulatory cascade during *in vitro* maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. *Reproduction*, v.146, p.27-35, 2013.
- Carvalho NAT, Bombonato PP, D'Angelo M, Baruselli PS.** Caracterização anatomofuncional do sistema genital de fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) e suas implicações na múltipla ovulação e transferência de embriões. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, p.95-103, 2011.
- Di Francesco S, Boccia L, Campanile G, Di Palo R, Vecchio D, Neglia G, Zicarelli L, Gasparrini B.** The effect of season on oocyte quality and developmental competence in Italian Mediterranean buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Anim Reprod Sci*, v.123, p.48-53, 2011.
- Drost M.** Advanced reproductive technology in the water buffalo. *Theriogenology*, v. 68, p. 450-453, 2007.
- Edwards JL, Hansen PJ.** Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol Reprod Dev*, v.46, p.138-45, 1997.
- El-Naby ASAH, Mahmoud KGHM, Ahmed YF, Abouel-Roos MEA, Abdel-Ghaffar AE.** Effect of Season of the year and Ovarian Structures on Oocytes Recovery Rate, Quality and Meiotic Competence in Egyptian Buffaloes. *Global Veterinaria*, v.10, n.4, p.408-412, 2013.
- Elamaram G, Singh KP, Singh MK, Chauhan MS, Manik RS, Palta P.** Oxygen Concentration and Cysteamine Supplementation During *In vitro* Production of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Embryos Affect mRNA Expression of BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BAX and BID. *Reprod Dom Anim*, v.47, p.1027-1036, 2012.
- Fagundes NS, Michalczechen-Lacerda VA, Caixeta ES, Machado GM, Rodrigues FC, Melo EO, Dode MAN, Franco MM.** Methylation status in the intragenic differentially methylated region of the IGF2 locus in *Bos taurus indicus* oocytes with different developmental competencies. *Mol Hum Reprod*, v.17, p.85-91, 2011.
- Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PAAS.** Maturação citoplasmática de oócitos bovinos: aquisição de competência para o desenvolvimento. *Rev Bras Reprod Anim*, v.32, p.172-181, 2008.
- Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PAAS.** Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, v.71, p.836-848, 2009.
- Fu Q, Liu ZF, Huang YL, Lu YQ, Zhang M.** Comparative Proteomic Analysis of Mature and Immature Oocytes of Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Int J Mol Sci*, v.17, p.1-10, 2016.
- Gasparrini B.** *In vitro* embryo production in buffalo: current situation and future perspectives. *Ital J Anim Sci*, v.6 (Suppl. 2), p.92-101, 2007.
- Gasparrini B, De Rosa A, Attanasio L, Boccia L, Di Palo R, Campanile G, Zicarelli L.** Influence of the duration of *in vitro* maturation and gamete co-incubation on the efficiency of *in vitro* embryo development in Italian Mediterranean buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim Reprod Sci*, v.105, p.354-364, 2008.
- Gottardi FP, Mingoti GZ.** Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o



- desenvolvimento do embrião. *Rev Bras Reprod Anim*, v.33, p.82-84, 2009.
- Gordon I.** Laboratory production of cattle embryos. Wallingford, UK: CABI International, 1994, 640p.
- Hunter RHF, Greve T.** Could artificial insemination of cattle be more fruitful? Penalties associated with aging eggs. *Reprod Domest Anim*, v.32, p.137-142, 1997.
- Jones GM, Cram DS, Song B, Magli MC, Gianaroli L, Kaplan OL, Findlay JK, Jenkin G, Trounson AO.** Gene expression profiling of human oocytes following *in vivo* or *in vitro* maturation. *Hum Reprod*, v.23, p.1138-1144, 2008.
- Kawamura K, Kumagai J, Sudo S, Chun SY, Pisarska M, Morita H, Toppari J, Fu P, Wade JD, Bathgate RA.** Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.101, p.7323-7328, 2004.
- Khaki A, Batavani R, Najafi G, Tahmasbian H, Belbasi A, Mokarizadeh A.** Effect of Leptin on *In Vitro* Nuclear Maturation and Apoptosis of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Oocyte. *Int J Fertil Steril*, v.8, p.43-50, 2014.
- Khairy MAZ, Adboon AS, Mahrous KF, Amer MA, Zaher MM, Li-Guo Y, El-Nahass EM.** Effects of season on the quality and *in vitro* maturation rate of Egyptian buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *J Cell Anim Biol*, v.1, p.29-33, 2007.
- Kim NH.** The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes during *in vitro* maturation. *Zygote*, v.8, p.25-32, 2000.
- Kim BK, Anower JM, Kang SR, Kim D, Chang-Hee HAN, Huh MK, Kamal T.** Effects of spermatozoa during *in vitro* meiosis progression in the porcine germinal vesicle oocytes. *Anim Reprod Sci*, v.104, p.83-92, 2008.
- Liang XW, Lu YQ, Chen MT, Zhang XF, Lu SS, Zhang M, Pang CY, Huang FX, Lu KH.** *In vitro* embryo production in buffalo (*Bubalus bubalis*) using sexed sperm and oocytes from ovum pick up. *Theriogenology*, v.69, p.822-826, 2008.
- Loneragan P, Gutierrez-Adan A, Rizos D, Pintado B, de la Fuente J, Boland MP.** Relative messenger RNA abundance in bovine oocytes collected *in vitro* or *in vivo* before and 20 hr after the pre-ovulatory luteinizing hormone surge. *Mol Reprod Dev*, v.66, p.297-305, 2003.
- Makita M, Ueda M, Miyano T.** The fertilization ability and development competence of bovine oocytes grown *in vitro*. *J Reprod Dev*, v.62, p.379-384, 2016.
- Manjunatha BM, Gupta PSP, Ravindra JP, Devaraj M, Ramesh HS, Nandi S.** *In vitro* developmental competence of buffalo oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology*, v.68, p.882-888, 2007.
- Millar JBA; Russell P.** The cdc 25 m-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. *Cell*, v.68, p.407-410, 1992.
- Misra AK, Kasiraj R, Mutha Rao M, Ranga Reddy NS, Jaiswal RS, Pant HC.** Rate of transport and development of preimplantation embryo in the superovulated buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.50, p.637-649, 1998.
- Mondadori RG, Santin TR, Fidelis AAG, Porfirio EP, Bão SN.** Buffalo (*Bubalus bubalis*) Pre Antral Follicle Population and Ultrastructural Characterization of Pre Antral Follicle Oocyte. *Reprod Dom Anim*, v.45, p.33-37, 2010a.
- Mondadori RG, Santin TR, Fidelis AAG, Name KPO, Silva JS, Rumpf R, Bão SN.** Ultrastructure of *in vitro* oocyte maturation in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Zygote*, v.18, p.309-314, 2010b.
- Nandi S, Chauhan MS, Palta P.** Effect of environmental temperature on quality and developmental competence *in vitro* of buffalo oocytes. *Vet Record*, v.148, p.278-279, 2001.
- Nandi S, Raghu HM, Ravindranatha BM, Chauhan MS.** Production of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Embryos *in vitro*: Premises and Promises. *Reprod Dom Anim*, v.37, p.65-74, 2002.
- Nandi S, Ravindranatha BM, Gupta PSP, Raghu HM, Sarma PV.** Developmental competence and post-thaw survivability of buffalo embryos produced *in vitro*: effect of growth factors in oocyte maturation medium and of embryo culture system. *Theriogenology*, v.60, p.1621-1631, 2003.
- Neglia G, Marino M, Di Palo R, Wilding M, Caracciolo Di Brienza V, Dale B, Gasparrini B, Zicarelli L.** A comparison of *in vitro* maturation in buffalo (*Bubalus bubalis*) and bovine oocytes using confocal microscopy. *Theriogenology*, v.55, p.488, 2001.
- Neglia G, Gasparrini B, Caracciolo Di Brienza V, Di Palo R, Campanile G, Presicce GA, Zicarelli L.** Bovine and buffalo *in vitro* embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology*, v.59, p. 23-30, 2003.
- Payton RR, Coy P, Romar R, Lawrence JL, Edwards JL.** Heat shock increase glutathione in bovine oocytes. *J Anim Sci*, v.81(Suppl.1), p.3, 2003a.
- Payton RR, Lawrence JL, Saxton AM, Dunlap JR, Edwards JL.** Cortical granule types and nuclear stage of bovine oocytes after exposure to elevated temperature during maturation. *Theriogenology*, v.59, p.496, 2003b.
- Picton HM, Briggs D, Gosden R.** The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol*, v.145, p.27-37, 1998.
- Purohit GN, Brady MS, Sharma, SS.** Influence of epidermal growth factor and insulin-like growth factor 1 on



- nuclear maturation and fertilization of buffalo cumulus oocyte complexes in serum free media and their subsequent development *in vitro*. *Anim Reprod Sci*, v.87, p.229-239, 2005.
- Rocha-Frigoni NAS, Leão BCS, Dall'Acqua PC, Mingoti GZ.** Improving the cytoplasmic maturation of bovine oocytes matured *in vitro* with intracellular and/or extracellular antioxidants is not associated with increased rates of embryo development. *Theriogenology*, v.86, p.1-9, 2016.
- Sharma GT, Dubey PK, Nath A, Saikumar G.** Co-culture of buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicles with antral follicles: a comparative study of developmental competence of oocytes derived from *in vivo* developed and *in vitro* cultured antral follicles. *Zygote*, v.21, p.286-294, 2012.
- Singh S, Dhandra OP, Malik RK.** Effect of the presence of corpus luteum on oocyte recovery and subsequent *in vitro* maturation and fertilization in buffaloes. *Asian-Aust. J Anim Sci.*, v.14, p.1675-1677, 2001.
- Singhal S, Prasad S, Singh B, Prasad JK, Gupta HP.** Effect of including growth factors and antioxidants in maturation medium used for *in vitro* culture of buffalo oocytes recovered *in vivo*. *Anim Reprod Sci*, v.113, p.44-50, 2009.
- Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML, First NL.** Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biology of reproduction*, v.40, p.1257-1263, 1989.
- Sirard MA, Coenen K, Bilodeau S.** Effects of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. *Theriogenology*, v.37, p.39-57, 1992.
- Sirard, MA.** Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*, v.55, p.1241-1254, 2001.
- Stitzel ML, Seydoux G.** Regulation of the oocyte-to-zygote-transition. *Science*, v.316, p.407-408, 2007.
- Somjai T, Imai K, Kaneda M, Akagi S, Watanabe S, Haraguchi S, Mizutani E, Dang-Nguyen TQ, Inaba Y, Geshi M, Nagai T.** The effect of ovary storage and *in vitro* maturation on mRNA levels in bovine oocytes; a possible impact of maternal ATP1A1 on blastocyst development in slaughterhouse-derived oocytes. *J Reprod Dev*, v.57, p.723-730, 2011.
- Thomas RE, Thompson J, Armstrong CG, Gilchrist RB.** Bovine cumulus-cell-oocyte gap junctional communication during *in vitro* maturation in response of cell-specific cyclic adenosine 3', 5'- monophosphate cyclic levels. *Biol Repr*, v.70, p.548-556, 2004.
- Watson AJ, De Sousa P, Caveney A, Barcroft LC, Natale D, Urquhart J, Westhusin, ME.** Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number and apoptosis. *BMC Biol of Reprod*, v.62, p.355-364, 2000.
- Yindee M, Techakumphu M, Lohachit C, Sirivaidyapong S, Na-Chiangmai A, Roelen BAJ, Colenbrander, B.** Maturation Competence of Swamp Buffalo Oocytes Obtained by Ovum Pick-Up and from Slaughterhouse Ovaries. *Reprod Dom Anim*, v.46, p.824-831, 2011.
- Yousaf MR, Chohan KR.** Nuclear morphology, diameter and meiotic competence of buffalo oocytes relative to follicle size. *Reprod Fertil Dev*, v.15, p.223-229, 2003.
- Van Den Hurk R, Zhao J.** Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, vol.63, p.1717-51, 2005.
-