

Oócitos bovinos: influência das estações do ano e maturação *in vitro* em meio enriquecido com quercetina

Isabella de Matos Brandão Carneiro, Ana Lúcia Almeida Santana, Poliana Almeida Bezerra, Laura Nicole Filipin da Costa, Gabriel Cândido Oliveira Silva, Rosimere Santana dos Santos, Laiara Fernandes Rocha, Larissa Pires Barbosa

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Centro, Rua Rui Barbosa, 710, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil. E-mails: isabella.brandao.c@hotmail.com, zootecana@gmail.com, polialmeida5@gmail.com, laura_nicolefc@hotmail.com, gabrielvet-@hotmail.com, rosivetsantana@gmail.com, laiaarafr@gmail.com, larissa@ufrb.edu.br

Resumo: Avaliou-se o efeito da estação do ano sobre a qualidade morfológica de oócitos bovinos e a suplementação do meio de maturação com quercetina. O experimento foi realizado em duas fases, sendo a primeira composta por dois tratamentos: T1-período de inverno e T2-período de verão, nos quais os ovários foram coletados em frigorífico e transferidos para laboratório, onde realizou-se a aspiração folicular, rastreamento dos oócitos em estereomicroscópio e classificação dos mesmos em função da sua qualidade morfológica. Na segunda fase, os ovários foram coletados, sendo os oócitos obtidos distribuídos em quatro tratamentos, constituídos pela suplementação do meio de maturação com T1-0; T2-50; T3-100 e T4-150 μ M de quercetina, e submetidos à maturação em estufa de CO₂ por 24 horas, e posteriormente avaliados quando à maturação. Os dados foram submetidos a análise de normalidade e análise de variância a 5% de significância. Houve diferença ($P>0,05$) para a qualidade morfológica dos oócitos, com maior número de oócitos viáveis produzidos no inverno (42,8%) em relação ao verão (10,2%), enquanto oócitos classificados como grau III (61,9%) e desnudos (27,9%) tiveram maior incidência no período de verão. A taxa de maturação com meio enriquecido com quercetina foi similar ($P>0,05$) entres os tratamentos, com média de 56,64%. Os resultados demonstram que a qualidade dos oócitos bovinos recuperados foi influenciada pela estação do ano, elevando-se durante os meses de baixas temperaturas, e que a adição de quercetina ao meio de maturação, nos níveis utilizados, não influenciam na taxa de maturação.

Palavras chave: Antioxidante, Aspiração folicular, Complexo *cumulus* oócito.

Bovine oocytes: influence of the seasons of the year and *in vitro* maturation in medium enriched with quercetina

Abstract: The effect of season of the year on the morphological quality of bovine oocytes and the supplementation of the maturation medium with quercetin were evaluated. The experiment was carried out in two phases, the first one consisting of two treatments: T1- winter period and T2-summer period, in which the ovaries were collected in a refrigerator and transferred to the laboratory, where was performed the follicular aspiration, oocyte tracking in stereomicroscope and classification of the oocytes according to their morphological quality. In the second phase, the ovaries were collected, and the oocytes were distributed in four treatments, constituted by the supplementation of the maturation medium with T1-0; T2-50; T3-100 and T4-150 μ M of quercetin, and submitted to maturation in CO₂ greenhouse for 24 hours, and later evaluated at maturity. Data were submitted to analysis of normality and analysis of variance at 5% of significance. There was a difference ($P> 0.05$) in the morphological quality of the oocytes, with a higher number of viable oocytes produced in winter (42.8%) compared to summer (10.2%), whereas oocytes classified as grade III (61.9%) and nude (27.9%) had higher incidence in the summer period. The maturation rate in quercetin enriched medium was similar ($P> 0.05$) between treatments, with an average of 56.64%; 55%; 66.67% and 51.35% for T1, T2, T3 and T4, respectively. The results show that the quality of bovine oocytes recovered was influenced by the season of the year, increasing during the months of low temperatures, and that the addition of quercetin to the maturation medium at the levels used does not influence the maturation rate.

Key words: Antioxidant, follicular aspiration, oocyte cumulus complex.

Introdução

O panorama em que se encontra a produção de bovinos no Brasil está diretamente ligado à aplicação de biotécnicas da reprodução. De acordo com Martins (2010), a produção de embrião *in vitro* (PIV) vem alcançando resultados superiores a outras biotecnologias aplicadas na espécie bovina, por permitir melhoramento genético com diminuição do intervalo entre gerações e aumento na intensidade de seleção, podendo ser aplicada em doadoras de diversas idades, não interferindo no estado fisiológico da mesma, além da possibilidade de usar fêmeas incapazes de se reproduzirem naturalmente.

A PIV compreende uma série de procedimentos laboratoriais especializados que incluem maturação (MIV), fertilização (FIV) e cultivo (CIV) *in vitro*, necessários para produzir embriões até o estágio de blastocisto, a partir de oócitos imaturos (Varago et al., 2008) e dentre as etapas da PIV, a eficiência na obtenção de oócitos de qualidade e a capacidade dos meios de maturação em fornecer ambiente e nutrição necessários ao seu desenvolvimento, estão intimamente ligados a eficiência da técnica, já que estão vinculados ao sucesso das fases subsequentes (Sekhar et al., 2010).

Fêmeas quando submetidas a um ambiente desfavorável, de altas temperaturas, sofrem desequilíbrio na homeostase corporal, com alterações comportamentais, hormonais e de constituição sanguínea, caracterizando o estresse térmico (Edwards et al., 2001, Paula-Lopes & Hansen, 2002), o qual afeta diretamente a qualidade do oócito. Além disso, durante a MIV, os oócitos são expostos a luminosidade e a diversas manipulações que culminam no aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) com resultante estresse oxidativo, provocando desequilíbrios que podem ser irreversíveis, o que provoca morte celular ou compromete o desenvolvimento embrionário e a viabilidade do produto (Guemra et al., 2013 & Sadeesh et al., 2014).

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da estação do ano sobre a qualidade morfológica de oócitos bovinos e a suplementação do meio de maturação com quercetina.

Material e métodos

O estudo foi conduzido em duas etapas experimentais, no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia [UFRB], localizado na cidade de Cruz das Almas-BA, nos períodos de junho de 2016 a março de 2017, de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso dos Animais da instituição (nº 23007007605/2016-32)

A primeira etapa experimental foi realizada em dois períodos, sendo o primeiro de junho a setembro de 2016 e o segundo dezembro de 2016 a março de 2017, para avaliar a qualidade morfológica de complexos *cumulus* oócitos nas diferentes estações do ano. Dessa forma, considerou-se dois tratamentos: T1 – inverno (n=2.164) e T2 – verão (n=3.037).

Durante o período experimental coletou-se semanalmente ovários bovinos no Frigorífico de Santo Antônio de Jesus (FRIGOSAJ), localizado na cidade de Santo Antônio de Jesus-BA. Os ovários foram coletados de fêmeas adultas em diferentes estágios fisiológicos, logo após o abate, no momento da evisceração e imediatamente acondicionados em garrafa térmica contendo solução salina (NaCl 0,9%) suplementada com 40µg/mL gentamicina (Vigor®) a 37 °C e transportados para o Laboratório de Reprodução Animal.

No laboratório, os ovários foram lavados com solução salina (NaCl 0,9%) aquecida a 37 °C, e os folículos com diâmetro entre 3 e 7mm foram aspirados com auxílio de agulha (1,20x40mm) conectada a seringa descartável de 10mL. O conteúdo folicular aspirado foi transferido para tubo de fundo cônico tipo Falcon de 50mL e mantido em banho-maria durante 15 minutos para decantação dos complexos *cumulus* oócitos (COCs). O sedimento decantado foi recolhido e disposto em placas de Petri de 35mm para rastreamento e classificação de oócitos sob aumento de 40X em estereomicroscópio.

Um total de 5.201 oócitos foram recuperados, sendo 2.164 no período de inverno e 3.037 no período de verão. Avaliou-se a qualidade dos COCs pela morfologia e a taxa de recuperação oocitária em cada período, calculada em função da quantidade de folículos aspirados e oócitos recuperados.

Para a classificação morfológica dos oócitos utilizou-se a classificação descrita por Viana et al. (2004), os quais levam em consideração o aspecto do citoplasma quanto a cor, homogeneidade e integridade, presença e número de camadas e grau de compactação das células do *cumulus*, onde: Grau I (Excelente),

Grau II (Bom), Grau III (Parcialmente desnudo), Grau IV (Desnudos) e Grau V (Atrésico).

O experimento foi realizado sob condições de temperatura mínima média de 19,9 °C e máxima média de 26,9 °C, com umidade relativa do ar média de 80%. As variáveis climatológicas foram coletadas da estação meteorológica do Instituto Nacional de Meteorologia [INMET], da qual se obtém dados referentes a toda microrregião do Recôncavo da Bahia.

A segunda etapa experimental ocorreu no período de dezembro de 2016 a março de 2017, para avaliar a adição de quercetina ao meio de maturação como fonte antioxidante. Os procedimentos de coleta e aspiração folicular foram iguais aos descritos na etapa experimental I.

Após rastreamento e classificação dos oócitos, segundo a descrição de Viana et al. (2004), apenas oócitos classificados como graus I e II foram utilizados para maturação. O meio de maturação foi constituído pelo Meio TCM199 (Sigma® M4530), suplementado com 10% de SFB, 10µL de FSH e 5µL de gentamicina (Vigor®).

A quercetina (Sigma® Q4951) foi preparada em solução estoque de 50mg/mL em hidróxido de sódio 1M, alíquotadas em microtubos de polipropileno e estocadas a -20 °C. Os oócitos viáveis (grau I e II) passaram por cinco gotas de lavagem, constituída pelo meio base de maturação, com a finalidade de retirar impurezas contidas no fluido folicular, e distribuídos aleatoriamente em quatro tratamentos: T1 – controle (meio de maturação base sem suplementação), T2, T3 e T4 – meio de maturação base suplementado com 30, 60 e 90% de quercetina (50, 100 e 150µM). Estes permaneceram durante 24 horas em gotas de

100µL de meio de maturação, imersas por óleo mineral (IrvineScientific® 9305), montadas em placas de Petri (150x15mm), e acondicionadas em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂. Cada gota continha uma faixa de 4-10 oócitos.

Passadas às 24 horas de incubação, os oócitos foram avaliados quanto a expansão das células do *cumulus* e presença do primeiro corpúsculo polar sob aumento de 40X em estereomicroscópio.

Os dados foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk. Por atenderem aos pressupostos da normalidade, os mesmos foram submetidos à análise de variância ANOVA, SPSS versão 23 (2015), adotando-se o nível de 5% de significância.

Resultados e discussão

A análise retrospectiva de dados meteorológicos tem possibilitado a identificação de duas épocas distintas em termos de temperatura e umidade relativa do ar na Região do Recôncavo da Bahia, que se caracteriza por um clima tropical. Dados bioclimáticos fornecidos pela INMET, entre os períodos estudados, demonstram consistências entre as estações de verão e inverno.

Dos ovários coletados ao longo dos períodos de verão e inverno, não houve diferença para número de folículos aspirados, oócitos recuperados e taxa de recuperação ($P > 0,05$). O número total de estruturas recuperadas no período de inverno foi de 2.164 e no verão foi de 3.037 oócitos, provenientes de 5.302 e 6.495 folículos, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1- Quantidade de folículos aspirados, oócitos recuperados, taxa de recuperação e oócitos viáveis nos períodos de verão e inverno, na Região do Recôncavo da Bahia.

Estação do ano	Folículos aspirados (n)	Oócitos recuperados (n)	Taxa de recuperação (%)
Inverno	5.302	2.164	40,8
Verão	6.495	3.037	46,8
P valor	0,18	0,14	0,67

Os dados referem-se à quantidade absoluta e foram submetidos a análise de variância e Teste F a 5% de significância.

Resultados semelhantes foram encontrados por Torres-Júnior et al. (2006) que ao estudarem o efeito do estresse térmico por calor na reprodução de fêmeas bovinas, com reflexo na PIV, não obtiveram efeito do agente estressor sobre a porcentagem de folículos aspirados e taxa de recuperação de oócitos. No entanto, quando se compara, em números, a taxa de recuperação oocitária encontrada no referido trabalho com a literatura consultada, percebe-se que a mesma está abaixo da média esperada (> 60%). Podendo ser explicada, pois a variável em questão é altamente dependente de fatores inerentes a técnica de aspiração, como a habilidade do técnico ao aspirar e rastrear oócitos na lupa, calibre da agulha e pressão de aspiração.

Segundo Crocomo et al. (2012), a eficiência na aspiração folicular é altamente dependente da pressão de aspiração, comprimento, calibre e largura da agulha utilizada. Bols et al. (1997) afirmaram em estudo realizado, que o diâmetro da agulha determina a qualidade dos complexos *cumulus* oócitos, sendo inversamente proporcionais, já que o menor diâmetro provoca maior atrito sobre os complexos e maior possibilidade de remoção das células do

cumulus. Já Rodríguez et al. (2006) constataram melhores resultados com agulhas curtas, isso porque menores danos celulares ocorrem quando existe um menor trajeto a ser percorrido, bem como menor probabilidade de perdas dos COCs.

Morton et al. (2008) estudaram o efeito da pressão de aspiração na qualidade COCs e detectaram que seringas de 10, 50, 30, 40 e 50 mL apresentaram taxa de recuperação de 69,5%; 50,5%; 44,8%; 36,5% e 28,3%, respectivamente. Podendo-se inferir que a seringa utilizada no presente estudo não apresentou efeito negativo sobre a aspiração folicular. No entanto, a habilidade do técnico em promover a pressão na aspiração, bem como o tamanho da agulha utilizada, podem ter contribuído para as baixas taxas de recuperação.

O período do ano promoveu efeito sobre a qualidade oocitária ($P < 0,05$). Obteve-se maior quantidade de oócitos grau I e grau II no período que compreende o inverno, enquanto oócitos classificados como grau III e desnudos tiveram maior incidência no período de verão. Oócitos classificados como atrésico foram encontrados nos dois períodos, entretanto não houve diferença entre verão e inverno ($P = 0,22$) (Tabela 2).

Tabela 2- Qualidade dos complexos *cumulus* oócitos oriundos de ovários de vacas de abatedouros nas estações de verão e inverno na Região do Recôncavo da Bahia.

Estação do ano	Grau I	Grau II	Grau III	Desnudo	Atrésico
Inverno	539a	404a	681a	540a	62
Verão	36b	273b	1879b	849b	41
P valor	0,00	0,04	0,00	0,04	0,22

Os dados referem-se à quantidade absoluta e foram submetidos a análise de variância e Teste F a 5% de significância.

Neste estudo, os oócitos classificados em grau I e II foram denominados oócitos viáveis, por apresentarem boa conformação das células do *cumulus* e citoplasma homogêneo, sendo assim considerados ideais para a produção de embrião *in vitro*. Embora esta avaliação não assegure a competência dos oócitos de se desenvolverem, serve como indicador de sua viabilidade, já que relatos demonstram que oócitos de citoplasma íntegro e a presença de células do *cumulus* apresentam melhor desempenho para a maturação nuclear, fecundação e

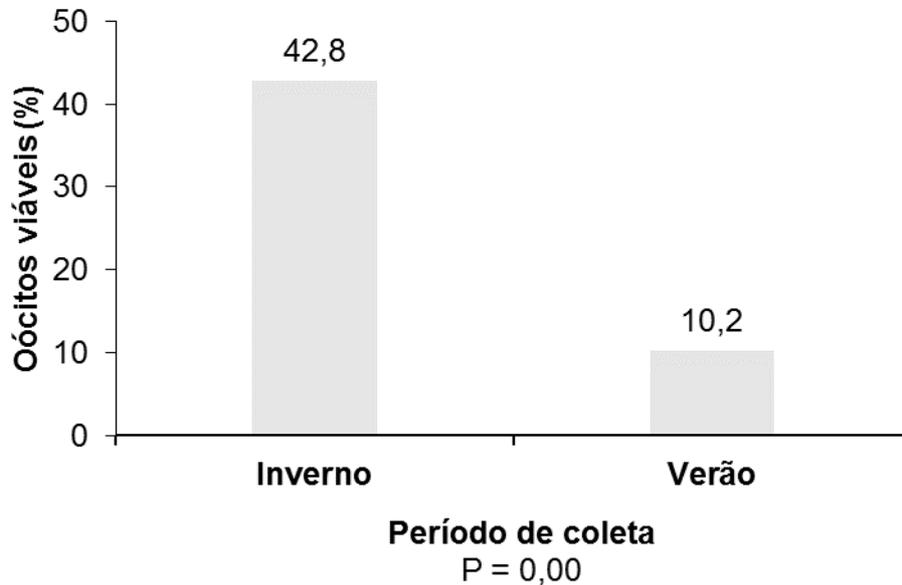
desenvolvimento *in vitro*, fato que evidencia a importância das células do *cumulus* na maturação do oócito *in vitro* (Gonçalves et al., 2002).

Houve diferença entre os períodos para o percentual de oócitos viáveis ($P = 0,00$) (Figura 1), corroborando com os achados de Fernandes et al. (2001), que ao avaliarem a função reprodutiva de fêmeas de corte em diferentes estações, obtiveram proporções superiores de oócitos viáveis no inverno (35,6%) quando comparados ao verão (19,6%) e Torres-Junior et al. (2006), que estudando o efeito da exposição

de fêmeas ao estresse térmico pelo calor, demonstraram o aumento da proporção de COCs

grau III e desnudos.

Figura 1- Oócitos viáveis obtidos de fêmeas bovinas provenientes de abatedouro coletados nos períodos de verão e inverno.



Estes achados refletem os mecanismos de termoproteção exercidos pelas células do *cumulus*, que se apresentam como barreira contra impacto negativo do estresse térmico e conseqüentemente se desprendem do oócito ou sofrem expansão (alteração de sua adesão), justificando o fato da população de oócitos viáveis ser maior no inverno e estruturalmente rica em células do *cumulus*, e o verão apresentar altas taxas de oócitos grau III e desnudos (Torres-Júnior et al., 2006). A ação negativa de altas temperaturas na reprodução animal também foi constatada por Kadarmideen (2015), que após realizarem coletas de complexos *cumulus* oócitos, relataram baixa qualidade oocitária, quando os mesmos eram coletados no período do verão, em fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus*, respectivamente.

Segundo Rocha et al. (2012), o número de oócitos viáveis está intimamente relacionado com o ambiente em que o animal está submetido e de acordo com Gama et al. (2007), em climas tropicais, elevada temperatura ambiente e umidade relativa do ar são determinantes no desempenho reprodutivo, interferindo na qualidade dos oócitos. Estudos realizados em gametas femininos submetidos à altas temperaturas demonstraram que o estresse térmico afeta as propriedades físicas e

bioquímicas das membranas celulares, conferindo diferença na morfologia de oócitos, através da alteração na síntese de proteínas e arquitetura de microtúbulos, aumento na produção de ROS, microfilamentos interrompidos, fuso meiótico desorganizados e ativação da cascata de apoptose.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a exposição de fêmeas a altas temperaturas, características do verão, exerceu um efeito retardado sobre a função reprodutiva, manifestada por uma incidência diminuída de oócitos de boa qualidade (viáveis), o que poderá refletir em diminutas taxas durante a produção *in vitro* de embriões bovinos, uma vez que a porcentagem de embriões produzidos é positivamente correlacionada com a qualidade dos oócitos recuperados.

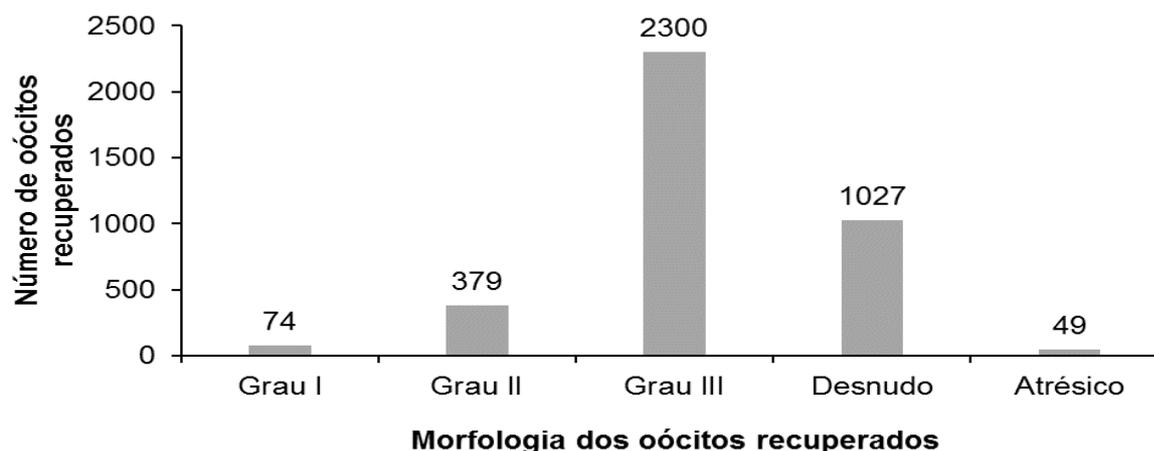
Os efeitos da suplementação do meio de maturação *in vitro* com diferentes concentrações do antioxidante quercetina, foram investigadas quanto a taxa de maturação. Dos ovários coletados em frigorífico, 8.000 folículos foram aspirados, dos quais houve recuperação de 3.829 COCs (Figura 2), com taxa média de recuperação de 47,86%.

Essa etapa experimental foi realizada no período que coincidiu com a estação de verão, que no Recôncavo da Bahia é conhecida por

suas elevadas temperaturas e umidade relativa do ar, as quais atuam de forma adversa na eficiência reprodutiva de fêmeas bovinas, principalmente no que diz respeito à competência oocitária em progredir na produção de embrião *in*

vitro, como elucidado na etapa experimental I. Isso justifica o fato de que, do total de estruturas recuperadas, a maior quantidade foi representada por oócitos grau III e desnudos (Figura 2).

Figura 2- Qualidade dos complexos *cumulus* oócitos oriundos de ovários de vacas de abatedouros na região do Recôncavo da Bahia.



Assim como na primeira etapa experimental, oócitos classificados como grau I e II foram considerados viáveis, já que conformação de células do *cumulus* e homogeneidade de citoplasma são indicativos favoráveis à maturação e demais etapas da produção de embriões *in vitro* (Gonçalves et al., 2002). Auclair et al. (2013) afirmam que a competência dos oócitos em se desenvolverem é dependente da estreita conexão com as células do *cumulus*. Embora o total de oócitos viáveis tenha sido de 453, apenas 300

foram utilizados e distribuídos aleatoriamente entre os quatro grupos experimentais.

A taxa de maturação foi similar ($P = 0,41$) entre os grupos, obtendo-se porcentagem média de 57,67% (G2, G3 e G4) para os oócitos submetidos a meios enriquecidos com quercetina e de 53,52% para o grupo controle (Tabela 3), corroborando com Guemra et al. (2013), que não obtiveram diferença entre grupos tratados com esse antioxidante e controle, com percentual de 80% e 76,6%, respectivamente.

Tabela 3- Número de oócitos imaturos, maturados e taxa de maturação de oócitos obtidos de ovários bovinos.

Tratamento	Oócitos imaturos (n)	Oócitos maturados (n)	Taxa de maturação (%)
0 μ M	71	38	53,52
50 μ M	80	44	55,00
100 μ M	75	50	66,67
150 μ M	74	38	51,35

Os dados referem-se ao número (n) de oócitos imaturos utilizados na etapa de maturação *in vitro* e maturados, bem como a taxa de maturação obtida, e por apresentarem comportamento normal pelo teste de Shapiro Willk, foram submetidos à análise de variância a 5% de significância e não apresentaram diferença estatística ($P = 0,41$).

Os resultados sugerem que a suplementação do meio de maturação com

quercetina é dispensável. Guemra et al. (2013) não encontraram diferenças para a taxa de

maturação e clivagem entre grupos tratados com quercetina e controle, reforçando a dispensável utilização da mesma. No entanto, a literatura preconiza o uso de antioxidantes na MIV, por serem necessários à conclusão da maturação e consequentemente desenvolvimento embrionário posterior, o que explica o fato desses autores relatarem um efeito positivo da adição de quercetina quando avaliaram as taxas de blastocisto, propondo que a mesma atuou na redução do estresse oxidativo.

A não diferença entre grupos tratados e controle no referente experimento, e nos estudos de Guemra et al. (2013) pode ser explicada pelo fato do meio base utilizado, TCM199, apresentar em sua composição o antioxidante glutatona e seus precursores (L-glutamina). Segundo Trindade et al. (2016), a L-glutamina, através da via glutamato, é um precursor direto da glutatona, a qual é considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula dos mamíferos, por agir de duas formas, detoxificando os ROS antes que ele cause lesão ou reparando a lesão ocorrida.

Segundo Liu et al. (2010) e Guemra et al. (2013), a quercetina sequestra espécies reativas de oxigênio, além de atuar na inibição de enzimas oxidativas, sendo capaz de reduzir danos celulares causados pelo estresse oxidativo, provenientes do excesso de manipulação e altas taxas de O₂ aos quais os oócitos são submetidos durante a produção de embrião *in vitro*. Contudo, quando se avalia as taxas de maturação da PIV nacional e as encontradas no presente estudos, nota-se que houve baixa eficiência do programa. Tal fato pode ser explicado pelo período de realização do experimento ter coincidido com o verão, podendo inferir que as altas temperaturas atuaram de forma a prejudicar a competência dos oócitos em progredir na etapa de maturação *in vitro*, devido possíveis alterações na estrutura do citoesqueleto e no rearranjo de microtúbulos essenciais para conclusão da maturação nuclear.

É sabido que a hipertermia e excesso de manipulação durante a PIV, atuam excedendo os níveis de ROS, que quando não controlados, podem ativar cascatas apoptóticas nos COCs e culminar em morte celular. Dessa forma, o uso da quercetina, bem como a ação da glutatona presente no meio base, podem ter reduzido os níveis de ROS e assim contribuíram para que as taxas de maturação não tenham sido ainda piores, já que a literatura descreve que a presença de antioxidante é essencial para a

maturação de oócitos, e necessária para o desenvolvimento embrionário (Silva et al., 2011).

Conclusão

A estação do ano influencia diretamente na qualidade morfológica dos COCs. Dessa forma, é recomendável que a implantação de programas de produção de embrião *in vitro* na região do Recôncavo da Bahia ocorra no período de inverno, quando os oócitos apresentam melhor qualidade, o que pode ser considerado como indicativo de sucesso nas etapas que compreendem a produção de embrião *in vitro*.

A suplementação do antioxidante quercetina no meio de maturação, não provocou efeito positivo na taxa de maturação oocitária, podendo ser dispensável nas dosagens testadas.

Referências

- Auclair, S., Uzbekov, R., Elis, S., Sanchez, L., Kireev, I., Lardic, L., Dalbies-Tran, R., & Uzbekova, S. (2013). Absence of cumulus cells during *in vitro* maturation affects lipid metabolism in bovine oocyte. *American Journal Physiological Endocrinol Metab* 67, E599–E613. Doi: 10.1152/ajpendo.00469.2012
- Bols, P. E., Ysebaert, M. T., Van Soom, A., & Kruif, A. (1997). Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology*, 47(6), 1221-1236. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00102-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00102-7)
- Crocomo, L. F., Marques Filho, W. C., Alvarenga, L. F. C., & Bicudo, S. D. (2012). Peculiaridades da coleta de oócitos para produção *in vitro* de embriões ovinos. *Revista Brasileira de Veterinária e Zootecnia*, 36 (1), 25-31.
- Edwards, J. L., King, W. A., Kawarsky, S. J., & Ealy, A. D. (2001). Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP70 and glutathione. *Theriogenology*, 55(1), 209-223. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00455-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00455-6)

- Fernandes, C. E., Dode, M. A. N., Godoy, K., & Rodovalho, N. (2001). Efeito estacional sobre características ovarianas e produção de oócitos em vacas *Bos indicus* no Mato Grosso do Sul. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 38 (3), 131-135. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-95962001000300007>
- Kadarmideen, H. N., Mazzoni, G., Watanabe, Y. F., Strøbech, L., Baruselli, P. S., Meirelles, F. V., Callesen, H., Hyttel, P., Ferraz, J. B. S. & Nogueira, M. F. G. (2015). Genomic selection of in vitro produced and somatic cell nuclear transfer embryos for rapid genetic improvement in cattle production. *Animal Reproduction*, 12 (3), 389-396.
- Gama Filho, R. V., Fonseca, F. A., Ueno, V. G., Fontes, R. S., Quirino, C. R., & Ramos, J. L. G. (2007). Sazonalidade na dinâmica folicular ovariana e produção embrionária em novilhas da raça Guzerá. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 44 (6), 422-427. Doi: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2007.26607>
- Gonçalves, B. D., Figueiredo, J. R., & Freitas, V. J. F. (2002). *Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal* (pp. 195-226). São Paulo: Varela.
- Guemra, S., Monzani, P. S., Santos, E. S., Zanin, R., Ohashi, O. M., Miranda, M. S., & Adona, P. R. (2013). Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia*, 65 (6), 1616-1624.
- Liu, S., Hou, W., Yao, P., Zhang, B., Sun, S., Nüssler, A. K., & Liu, L. (2010). Quercetin protects against ethanol-induced oxidative damage in rat primary hepatocytes. *Toxicology In vitro*, 24 (2), 516- 522. Doi: 10.1016/j.tiv.2009.03.006
- Martins, C. F. (2010). O impacto da transferência de embriões e da fecundação *in vitro* na produção de bovinos no Brasil. Embrapa Cerrados: INFOTECA-E. Recuperado de <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/875061>
- Morton, K.M., Maxwell, W.M.C., & Evans, G. (2008). Effect of aspiration pressure during oocyte harvesting on oocyte recovery and *in vitro* development of ovine oocytes. *Reproduction Domestic Animals*, 43 (1), 106-110. Doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.00866.x.
- Paula-Lopes, F. F., & Hansen, P. J. (2002). Heat-shock Induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally-regulated phenomenon. *Biology of Reproduction*, 66 (4), 1169-77.
- Rocha, D. R., Salles, M. G. F., Moura, A. A. A. N., & Araújo, A. A. (2012). Impacto do estresse térmico na reprodução da fêmea bovina. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, 36 (1), 18-24.
- Rodríguez, C., Anel, L., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J.C., Chamorro, C.A., & Paz, P. (2006). Ovum pick-up in sheep: a comparison between different aspiration devices for optimal oocyte retrieval. *Reproduction Domestic Animals*, 41 (2), 106-113. Doi: 10.1111/j.1439-0531.2006.00648.x
- Sadeesh, E. M., Shah, F., Balhara, A. K., Thirumaran, S. M. K., Yadav, S., & Yadav, P. S. (2014). Effect of growth factor and antioxidant on *in vitro* maturation of oocytes and cleavage rates of *in vitro* produced Indian buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Veterinarsky Arhiv*, 84 (5), 459-474.
- Sekhar, K., Priyanka, B., Reddy, V. D., & Rao, K. V. (2010). Isolation and characterization of a pigeonpea cyclophilin (CcCYP) gene, and its over-expression in *Arabidopsis* confers multiple abiotic stress tolerance. *Plant, Cell & Environment*, 33 (8), 1324-1338. Doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02151.x.
- Silva, L. K. X., Reis, A. N., Silva, A. O. A., Sousa, J. S., Souza, A. J. O., & Vale, W. G. (2011). Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação por diferentes períodos de tempo sem controle da atmosfera gasosa. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63(1), 74-80.
- Statistical Package for the Social Sciences. (2015). *Ibm Spss Statistics (Versão 23)* [Software]. Recuperado de <http://www01.ibm.com/software/analytics/spss/products/statistics/>.
- Torres-Júnior, J. R. S., Pires, M. F. A., Sá, W. F., Ferreira, A. M., Viana, J. H. M., Camargo, L. S. A., Ramos, A. A., Folhadella, I. M., Polisseni, J., Freitas, C., Clemente, C. A. A., Sá Filho, M. F., Souza, A. H., Martins, C. M., & Baruselli, P. S.

(2006). Efeito da codominância de folículos no momento da aspiração folicular sobre a recuperação e competência *in vitro* de oócitos (*Bos indicus*). Anais da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 20. *Acta Scientiae Veterinariae*, 34 (supl. 1), 473-473

Trindade, M. C., Macente, B. I., Vicente, R. R. W., & Apparício, M. (2016). Estresse oxidativo na produção *in vitro* de embriões bovinos: Revisão de Literatura. *Revista Investigação Mecina Veterinária*, 15 (1), 37-45.

Varago, F. C., Mendonça, L. F., & Lagares, M.A. (2008). Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, 32 (2), 100-109.

Viana, J. H. M., Camargo, L. S. A., Ferreira, A. M., Sa, W.F., Fernandes, C. A. C., Marques Junior, A. P. (2004). Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. *Animal Reproduction Science*, 84 (1-2), 1-12. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2003.12.002

Recebido em: 10/05/2018
Aceito em: 28/03/2019