

Cinética da maturação nuclear *in vitro* de oócitos bubalinos

Nuclear maturation kinetics *in vitro* of buffalo oocytes

Correspondência para:
SIMONE DO SOCORRO DAMASCENO
SANTOS
Laboratório de Fertilização *in vitro*
Centro de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Pará
66075-900 - Belém - PA
e-mail: damasc@ufpa.br

1- Laboratório de Fertilização *in vitro* do
CCB da UFPA, Belém - PA

Simone do Socorro Damasceno SANTOS¹, Jedina Kato DANTAS¹,
Moisés dos Santos MIRANDA¹, Flávia Costa BIONDI¹, Otávio Mítio OHASHI¹

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a cinética da maturação *in vitro* de oócitos bubalinos, foram cultivados 1.619 oócitos com *cumulus oophorus* compacto em quatro diferentes tratamentos: T1 - TCM 199 com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (meio base); T2 - Meio base e células da granulosa (CG); T3 - Meio base, CG, 10 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) e 10 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG); T4 - Meio base, 10 UI de eCG, 10UI de hCG e 1 µg de 17β-estradiol / ml, em tempos de 14 a 17h, 20 a 22h, 23 a 25h, 26 a 28h, 29h e 32h de cultivo em estufa de CO₂ a 5% e temperatura de 38,5°C. No tratamento 1, observou-se que 81,83%, 69,61%, 65,88%, 60,28%, 64,98% e 67,67% dos ovócitos reiniciaram a meiose. No tratamento 2, as taxas de reinício da meiose foram de 76,06%, 72,06%, 69,78%, 68,12%, 74,97% e 89,96%, no tratamento 3 estes percentuais foram de 83,59%, 78,86%, 77,49%, 82,4%, 72,92% e 81,06% e com o tratamento 4 os índices foram de 95,0%, 91,82%, 93,17%, 91,65%, 92,09% e 74,99% nos tempos de 14 a 17h, 20 a 22h, 23 a 25h, 26 a 28h, 29h e 32h de cultivo, respectivamente, podendo-se concluir que o meio com maior suplementação proporciona maior taxa de reinício da meiose em menor tempo, assim como o aumento no tempo de cultivo pode levar a maiores índices de degeneração.

PALAVRAS-CHAVES: Maturação *in vitro*. Oócito. Búfalo.

INTRODUÇÃO

O conhecimento da regulação do crescimento folicular e da maturação ovocitária é de grande importância no desenvolvimento e aperfeiçoamento de novas biotecnologias como a fertilização *in vitro* e transferência de núcleo. A capacidade de fecundação e desenvolvimento embrionário depende da maturação nuclear e citoplasmática do oócito⁸ e entre os fatores que podem influenciar na maturação ovocitária estão a atmosfera gasosa, meio de cultivo, temperatura, suplementação protéica e fatores de crescimento. Vários métodos têm sido utilizados para aumentar a taxa de maturação, tais como adição de fatores de crescimento, soro fetal bovino, soro de fêmea em estro, hormônios e líquido folicular ao meio de cultivo^{19, 28, 6, 9, 13} e ainda co-cultivo com células do *cumulus* e células da granulosa^{26, 11, 13}, entretanto estas condições não são similares àquelas apresentadas *in vivo*.

A cinética da maturação nuclear ovocitária *in vitro* foi avaliada em bovinos^{26, 3, 1, 16, 10} e em bubalinos^{21, 17, 12, 27}, contudo os resultados diferem entre si. Tendo em vista os poucos conhecimentos sobre a espécie bubalina, este trabalho teve por objetivo analisar a cinética da maturação nuclear *in vitro* de oócitos bubalinos utilizando-se 4 tratamentos em diferentes tempos de maturação.

MATERIAL E MÉTODO

Ovários e oócitos

Ovários de búfalas gestantes e não gestantes, provenientes da Ilha do Marajó foram coletados logo após o abate, lavados em álcool a 70° GL e solução salina a 0,9% com antibióticos e em seguida acondicionados em frascos estéreis contendo solução de fosfato salino tamponado (PBS), sendo transportados ao Laboratório de Fertilização *in vitro* da Universidade Federal do Pará.

Foram puncionados folículos que apresentavam diâmetro entre 2 e 8 mm, utilizando-se seringas (10 ml) e agulhas descartáveis (25 x 8), contendo meio 199 (Sigma M 5017) com HEPES (Sigma H 0763 e H 9136) e 10% de soro fetal bubalino (meio de lavagem). Sob lupa, os oócitos foram então colhidos com pipetador automático e colocados em uma placa de cultura descartável estéril de 35x10mm, contendo meio de lavagem, para classificação e seleção de acordo com a quantidade de células do *cumulus*. Uma amostra foi fixada logo após a aspiração folicular para avaliar o estágio da meiose em que se encontravam.

Cultivo *in vitro*

Oócitos com *cumulus oophorus* compacto (n = 1619) foram cultivados em 4 tratamentos: **Tratamento 1**- Meio

199 acrescido de 10% de soro fetal bovino (meio base de maturação); **Tratamento 2** – Meio base de maturação acrescido de células da granulosa (CG); **Tratamento 3** - Meio base de maturação acrescido de CG, 10 U.I. de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) (Intergonan – Intervet) e 10 U.I. de Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) (Pregnyl – Organon); **Tratamento 4** - Meio base de maturação acrescido de 10 U.I. de eCG, 10 U.I. de hCG e 1µg/ml de estradiol (Sigma - E 2758).

Os oócitos foram cultivados pelos períodos de 14 a 17h, 20 a 22h, 23 a 25h, 26 a 28h, 29h e 32h horas em estufa de cultura a 38,5°C e atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após a maturação foram desnudados por pipetagens sucessivas, colocados entre lâmina e lamínula e fixados em etanol e ácido acético (3:1) por 24 horas e, posteriormente corados com orceína acética a 1%, observando-se sob microscopia óptica de imersão (1000x) imediatamente após a coloração sendo classificados como:

Não Definido (N.D) - oócitos onde não era possível identificar a fase da meiose devido a presença de células do cúmulus ou da corona radiata (falha no processo de desnudamento);

Degenerado (Deg.) - oócitos que se apresentavam vacuolizados, não sendo possível a visualização dos cromossomos;

Vesícula Germinativa (V.G.) – núcleo definido, com ou sem nucléolo, sem condensação da cromatina;

Rompimento de Vesícula Germinativa (G.V.B.D. - Germinative Vesicle Break-Down) - final da Prófase I com condensação da cromatina (Diacinese);

Metáfase I (M I) - cromossomos já condensados formando a placa equatorial ou início da formação da mesma;

Anáfase I (A I) - início da migração dos cromossomos

para os pólos da célula com fibras do fuso aparentes;

Telófase I (T I) - cromossomos já nos pólos, com fibras do fuso aparentes;

Metáfase II (M II) - cromossomos formando a placa equatorial com 1º corpúsculo polar já exteriorizado.

RESULTADOS

Oócitos com cumulus compacto (n=102) analisados logo após a aspiração folicular apresentaram-se degenerados (22,5%), em VG (55,88%), em GVBD (11,76%), em M I (2,94%), em T I (0,98%) e M II (5,88%).

Cultivo dos oócitos

Foram utilizados 1619 oócitos com *cumulus oophorus* compacto sendo os resultados sumarizados nas tabelas abaixo.

No **tratamento 1** (Tab. 1), observou-se que o percentual de oócitos degenerados aumentou gradativamente, de acordo com o aumento do tempo de cultivo e que entre 2 a 21% permaneciam em VG. Com o tempo de 14 a 17h, o percentual de oócitos em M II foi de 11,37% e em 29 e 32 h este percentual aumentou para 54,54% e 58,58%, respectivamente, mostrando que em meio sem suplementação o reinício da meiose é retardado, necessitando de maior tempo para a completa maturação nuclear porém este fato acarreta maiores índices de degeneração.

Com o **tratamento 2** (Tab. 2), o percentual de VG variou entre 4,42 a 17,7% e o percentual de M II em 14 a 17h foi de 12,37% aumentando de acordo com o tempo, sendo que em 26 a 28h, 29h e 32h obteve-se 43,34%, 53,32% e 49,24%, respectivamente, observando-se que com a associação das células da granulosa com maior tempo de cultivo parece ocorrer uma leve aceleração no reinício da

Tabela 1

Estágio da meiose de ovócitos bubalinos com *cumulus oophorus* compacto diferentes tempos de cultivo com tratamento 1.

Tempo	Deg	ND	VG	GVBD	MI	A I	T I	M II
14 a 17	1,63%	4,91%	11,47%	27,86%	27,86%	1,63%	13,11%	11,37%
20 a 22	12,5%	7,14%	10,71%	20,53%	11,71%	2,23%	16,4%	18,74%
23 a 25	25,0%	6,82%	2,28%	13,64%	6,82%	—	—	45,42%
26 a 28	19,11%	2,94%	17,64%	11,76%	10,29%	—	2,94%	35,29%
29	14,77%	15,69%	4,53%	4,54%	4,54%	—	1,36%	54,54%
32	12,12%	—	20,21%	9,09%	—	—	—	58,58%

Tabela 2

Estágio da meiose de ovócitos bubalinos com *cumulus oophorus* compacto em diferentes tempos de cultivo com tratamento 2.

Tempo	Deg	ND	VG	GVBD	MI	A I	T I	M II
14 a 17	19,46%	—	4,42%	31,85%	15,04%	7,07%	9,73%	12,37%
20 a 22	12,5%	—	15,11%	10,46%	15,95%	7,32%	14,62%	23,71%
23 a 25	12,5%	—	17,7%	26,04%	12,5%	2,08%	6,25%	22,91%
26 a 28	23,34%	3,34%	5,0%	5,0%	13,34%	3,1%	3,34%	43,34%
29	1,66%	15,83%	7,5%	11,66%	8,33%	—	1,66%	53,32%
32	—	3,33%	6,66%	16,66%	18,33%	—	5,33%	49,64%

Tabela 3

Estágio da meiose de ovócitos bubalinos com *cumulus oophorus* compacto em diferentes tempos de cultivo com tratamento 3.

Tempo	Deg	ND	VG	GVBD	MI	A I	T I	MII
14 a 17	5,17%	8,01%	2,73	30,61%	27,0%	5,47%	8,21%	12,3%
20 a 22	18,3%	—	2,81	15,5 %	11,26	9,85%	8,45 %	33,8%
23 a 25	12,5%	5,0%	5,0%	18,33%	5,0%	4,16%	5,0%	45,0%
26 a 28	8,8%	5,6%	3,2%	1,6%	1,6%	0,8%	6,4%	72,0%
29	—	22,35%	4,7%	5,88%	2,35%	—	5,88%	58,81%
32	11,4%	7,44%	—	18,51%	5,7%	—	8,79	48,06%

Tabela 4

Estágio da meiose de ovócitos bubalinos com *cumulus oophorus* compacto em diferentes tempos de cultivo com tratamento 4.

Tempo	Deg	ND	VG	GVBD	MI	A I	T I	MII
14 a 17	—	5,0%	—	25,0%	22,5%	—	25,0%	22,5%
20 a 22	4,08%	4,08%	—	4,08%	6,12%	—	—	81,62%
23 a 25	—	6,81%	—	—	2,27%	—	—	90,9%
26 a 28	3,33%	3,33%	1,66%	6,66%	1,66%	—	8,33%	75,0%
29	—	7,89%	—	2,63%	2,63%	—	10,52%	76,31%
32	18,18%	4,54%	2,27%	—	—	—	—	74,99%

meiose, observando-se diversos estágios intermediários e menor percentual de degenerados.

No **tratamento 3** (Tab. 3), houve maior índice de reinício de meiose obtendo-se percentuais de VG entre 2,73 e 5,0%, assim como menor percentual de degenerados e maiores valores de estágios intermediários da meiose obtendo-se maior índice de MII no tempo de 26 a 28h de cultivo.

Com o **tratamento 4** (Tab. 4), os índices de VG foram de 1,66 e 2,27% nos tempos de 16 a 28 e 32 h, obtendo-se maiores taxas de M II, que variaram de 22, 5% no tempo de 14 a 17h a 74,99% em 32 h, com o maior valor obtido em 23 a 25h (90,9%).

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na análise logo após a punção folicular diferem dos resultados encontrados em bovinos^{26,10} e em bubalinos¹², sendo aproximados aos obtidos por SINGH & MAJUMDAR²¹ também em búfalos, mostrando uma grande variação entre e dentre as espécies, podendo sofrer influências genéticas e nutricionais.

A presença de soro fetal se faz necessária para a maturação ovocitária⁵ porém YOUNIS *et al.*²⁸ e SCHELLENDER *et al.*²⁰ obtiveram em bovinos 62,9% e 39,3% de M II, respectivamente, utilizando apenas meio com soro fetal. As taxas de maturação obtidas com o tratamento 1 nos diversos períodos de cultivo foram inferiores aos resultados obtidos por XU *et al.*²⁶, YOUNIS *et al.*²⁸, SCHELLENDER *et al.*²⁰, OLIVEIRA-FILHO *et al.*¹⁸, ADONA *et al.*¹ e DODE & ADONA¹⁰ em bovinos, SINGH & MAJUMDAR²¹, KAMONPATANA & CHUANGSOONGNEON¹² e YADAV

*et al.*²⁷ em bubalinos, porém foram semelhantes às de TOTTEY *et al.*²⁴. Estes resultados podem ser decorrentes da pouca suplementação do meio (somente soro fetal) que não é um bom suporte para a completa maturação nuclear, levando a altos índices de degeneração.

A ocorrência de maior taxa de maturação com o tratamento 1 em 29 e 32 h de cultivo explica-se talvez pelo fato de que em cultivo sem células da granulosa ou hormônios haja necessidade de maior tempo para que ocorra maturação completa, assim como pode ocorrer maior percentual de degenerados devido ao longo período de cultivo.

A presença de células da granulosa favorece a maturação ovocitária *in vitro* em bovinos^{22,2,14,7} e contrastando com isto, LEIBFRIED-RUTLEDGE *et al.*¹⁵ observaram que células da granulosa diminuem as taxas de M II porém, os resultados obtidos no tratamento 2 foram inferiores aos reportados por COSTA⁷, observando-se que a presença das células da granulosa não beneficiou a maturação *in vitro* em bubalinos, obtendo-se melhores resultados somente nos tempos de cultivo mais longos. Os percentuais obtidos com o T2 foram inferiores aos de XU *et al.*²⁶, ADONA *et al.*¹ e DODE & ADONA¹⁰ em bovinos, SINGH & MAJUMDAR²¹, KAMONPATANA & CHUANGSOONGNEON¹² e YADAV *et al.*²⁷ em bubalinos, mostrando que somente o meio 199 com SFB e células da granulosa não são suficientes para a maturação nuclear em bubalinos.

Hormônios gonadotróficos têm sido comumente utilizados para melhorar as taxas de maturação^{26,20,24,25,12,1,10} contudo, seus efeitos são discutidos e sua importância é bastante controversa, sendo sua utilização baseada no fato de que estão envolvidos no processo de ovulação.

Com o tratamento 3 os resultados foram inferiores aos de XU *et al.*²⁶, ADONA *et al.*¹ e DODE & ADONA¹⁰ em bovinos, YADAV *et al.*²⁷ em bubalinos e superiores aos de SINGH & MAJUMDAR²¹, porém foram semelhantes aos de KAMONPATANA & CHUANGSOONGNEON¹² também em bubalinos, mostrando que a adição de gonadotrofinas ao meio de cultivo permite maior percentual de maturação nuclear que com os tratamentos 1 e 2, sendo o valor máximo de MII (72%) obtido em 26 a 28 h de cultivo.

Os esteróides são necessários para que ocorra o rompimento da vesícula germinativa e a completa maturação²³ e segundo BEVERS *et al.*⁴ o estradiol não afeta a progressão da meiose mas aumenta as taxas de fecundação e clivagem. Com o tratamento 4, as taxas de maturação obtidas nos

diferentes tempos foram superiores aos encontrados por XU *et al.*²⁶ em bovinos e SINGH & MAJUMDAR²¹, KAMONPATANA & CHUANGSOONGNEON¹² e YADAV *et al.*²⁷ em bubalinos sendo porém semelhantes aos de BENEDETTI *et al.*³, ADONA *et al.*¹ e DODE & ADONA¹⁰ em bovinos podendo-se concluir que com a suplementação do meio com gonadotrofinas e estradiol a maturação nuclear ocorre normalmente, obtendo-se elevados percentuais de M II e baixos índices de degeneração. Com o tratamento 4 ocorreu uma diferença entre 14 a 17 h e os demais tempos de cultivo sendo possível devido ao fato de que o tempo de 14 a 17 h de cultivo é um período relativamente curto para a maturação nuclear mesmo em meios com suplementação hormonal.

SUMMARY

To evaluate the kinetics of the *in vitro* maturation of buffalo oocytes, 1.619 oocytes with compact *cumulus oophorus* were cultivated in different treatments: T1 - TCM 199 with 10% of bovine foetal serum (BFS) (basic medium); T2 - Medium basic and granulosa cells (GC); T3 - Basic medium, GC, 10 IU of eCG and 10 IU of hCG; T4 - Basic medium, 10 IU of eCG, 10 IU of hCG and 1 µg 17β-estradiol / ml, in times 14 to 17 h, 20 to 22 h, 23 to 25 h, 26 to 28 h, 29 h and 32 h of cultivation in CO₂ incubator at 5% and temperature of 38,5°C. In the treatment 1, it was observed that 81,83%, 69,61%, 65,88%, 60,28%, 64,98% and 67,67% of the oocytes restarted the meiosis; with the treatment 2, rates of oocytes restart of the meiosis were of 76,06%, 72,06%, 69,78%, 68,12%, 74,97% and 89,96%; with the treatment 3 rates were of 83,59%, 78,86%, 77,49%, 82,4%, 72,92% and 81,06% and with the treatment 4 the rates were of 95,0%, 91,82%, 93, 17%, 91,65%, 92,09% and 74,99% in the times from 14 to 17 h, 20 to 22 h, 23 to 25 h, 26 to 28 h, 29 h and 32 h of culture, respectively, could be concluded that the supplemented medium provides larger rates of restarted of the meiosis in smaller time, as well as the increase in the time of cultivation it can take to largest rates of degeneration.

KEY-WORDS: *In vitro* maturation. Oocytes. Buffalo.

REFERÊNCIAS

- 1-ADONA, P.R.; DODE, M.A.N.; RODOVALHO, N.C.; LEGUIZAMON, G. Nuclear maturation kinetics of zebu oocytes in presence or absence of hormones. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 26, n. 1, p. 205, 1998.
- 2-BARILE, V.L.; DELL'AQUILA, M.E.; CINONE, M. & MINOIA, P. *In vitro* maturation and fertilization of follicular oocytes in cattle. **Boll. Soc. It. Biol. Sper.** v. 66, n. 9, p.899-906, 1990.
- 3-BENEDETTI, A.R.; SAALFELD, H.H.; SOUZA, R.V.; RUMPF, R. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 25, n. 1, p. 184, 1997.
- 4-BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; VAN DER HURK, R.; IZADYER, F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology** v.47, p. 13-22, 1997.
- 5-BRACKET, B.G. A review of bovine fertilization *in vitro*. **Theriogenology** v.19, n.1, p. 1-15, 1983.
- 6-BRACKET, B.G.; YOUNIS, A.I.; FAYRER-HUSKED, A.R. Enhanced viability after *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro* with high concentrations of luteinizing hormone. **Fertil. Steril.** v. 52: 319-324, 1989.
- 7-COSTA, E.P. **Aspectos morfológicos (citológicos e ultra-estruturais) e desenvolvimento de oócitos de bovinos *in vitro***. Tese de Doutorado, E.V/ UFMG, 1994, 155p.
- 8-CRITSER, E.S.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; EYESTONE, W.H.; NORTHEY, D.L. & FIRST, N.L. A Acquisition of development competence during maturation *in vitro*. **Theriogenology** v. 25: 150, 1986. abst.
- 9-DAS, K.; STONT, L.E.; HENSLEIGH, H.C.; TOGATZ, G.E.; PHIPPS, W.R. & LEUNG, B.S. Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. **Fertil. Steril.** v. 55: 1000-1004, 1991.
- 10-DODE, M.A.N. & ADONA, P. R. Developmental capacity of Bos indicus oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6-dimethylaminopurine. **Anim. Reprod. Sci.** v. 65, p. 171-180, 2001.
- 11-FUKUI, Y. & ONO, H. *In vitro* development to blastocyst of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes. **Vet. Rec.** v. 122, p. 282, 1988.
- 12-KAMONPATANA, M. & CHUANGSOONGNEON, U. Time related to *in vitro* maturation of immature oocytes in swamp buffaloes. **Buffalo J. (Suppl)** v. 2, p. 135-146, 1994.
- 13-KIM, K.S.; MITSUMIZO, N.; FUJITA, K. & UTSUMI, K. The effects of follicular fluid on *in vitro* maturation, oocyte fertilization and the development of bovine embryos. **Theriogenology** v. 45, p. 787-799, 1996.
- 14-KOBAYASHI, K.; TAKAGI, Y.; SATOH, T.; HOSHI, H.; OIKAWA, T. Development of early bovine embryos to the blastocyst stage in

serum-free conditioned medium from bovine granulosa cells. **In Vitro Cell Dev. Biol.** v.28 A, p. 255-259, 1992.

15-LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; CRITSER, E.S.; EYESTONE, W.H.; NORTHEY, D.L.; FIRST, N.L. Developmental potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. **Biol. Reprod.** v. 36, p. 376-383, 1989.

16-LUNA, H.S.; RUMPF, R.; LUNA, H.; CÂMARA, J.U.; CARMO, T.F.M., FERRARI, I. Alterações cromossômicas em oócitos bovinos maturados *in vitro*. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 27, n. 1, p. 252, 1999.

17-MADAN, M.L.; SINGLA, S.K.; CHAUHAN, M.B. & MANIK, R.S. *In vitro* production and transfer of embryos in buffaloes. **Theriogenology** v.41, p. 139-143, 1994.

18-OLIVEIRA-FILHO, E.B.; CATT, J.; GARCIA, J.M. & ESPER, C.R. *In vitro* fertilization in zebu cattle (*Bos indicus*): Some peculiarities affecting early development. **XII Intern. Congress on Anim. Reproduction** Proceedings v. 3, P. 1330-1332, 1992.

19-SANBUISHO, A. & THRELFALL, W.R. The effects of estrous cow serum on the *in vitro* maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte. **Theriogenology** v.31, n. 3, p. 693-699, 1989.

20-SCHEELLANDER, K.; FUHRER, F.; BRACKETT, B.G.; KORB, H. & SCHLEGER, W. *In vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrous cow serum. **Theriogenology** v. 33, n.2, p. 477-485, 1990.

21-SINGH, R. & MAJUMDAR, A.C. Chronological changes of buffalo follicular oocytes maturation *in vitro*. **Indian J. Anim. Sci.** v. 62, n. 3, p. 205-209, 1992.

22-SIRARD, M.A; PARRISH, J.J.; WARE, C.B.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L. & FIRST, N.L. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. **Biol. Reprod.** v. 39, p. 546-552, 1988.

23-THIBAUT, C. Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes? **J. Reprod. Fert.** v. 51, p. 1-15, 1977.

24-TOTEY, S.M.; TANEJA, M. PAWSHE, C.H.; SINGH, G. & TALWAR, G.P. *In vitro* maturation, fertilization and development of buffalo oocytes. **III world Buffalo Congress** Proceedings vol. III, p. 610-617, 1991.

25-TOTEY, S.M.; SINGH, G.; TANEJA, M.; PAWSHE, C.H. & TALWAR, G.P. *In vitro* maturation, fertilization and development of follicular oocytes from buffalo (*Bubalus bubalis*) **J. Reprod. Fert.** v.95, n. 2, p. 597-607, 1992.

26-XU, K.P.; GREVE, T.; SMITH, S. & HYTTEL, P. Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation *in vitro*. **Acta Vet. Scand.** v. 27, p. 505-519, 1986.

27-YADAV, B.R.; KATIYAR, P.K.; CHAUHAN, M.S.; MADAN, M.L. Chromosome configuration during *in vitro* maturation of goat, sheep and buffalo oocytes. **Theriogenology** v. 47, p. 943-95, 1997.

28-YOUNIS, A.I.; BRACKETT, B.G. & FAYRER-HOSKEN, R.A. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Gamete Research** v. 23, p. 189-201, 1989.

Recebido para publicação: 18/10/2001
Aprovado para publicação: 31/07/2002