

LAURA VANESSA MOURÃO GULART

MEIOS DE CULTIVO PARA MATURAÇÃO DE OÓCITOS E PRODUÇÃO DE  
EMBRIÕES AVALIADOS POR MARCADORES MOLECULARES

BRASÍLIA, 2015

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LAURA VANESSA MOURÃO GULART

MEIOS DE CULTIVO PARA MATURAÇÃO DE OÓCITOS E PRODUÇÃO DE  
EMBRIÕES AVALIADOS POR MARCADORES MOLECULARES

Tese apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do Título de Doutor em Ciências da  
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Alzira Amélia Martins Rosa e Silva

BRASÍLIA  
2015

LAURA VANESSA MOURÃO GULART

MEIOS DE CULTIVO PARA MATURAÇÃO DE OÓCITOS E PRODUÇÃO DE  
EMBRIÕES AVALIADOS POR MARCADORES MOLECULARES

Tese apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do Título de Doutor em Ciências da  
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Alzira Amélia Martins Rosa e Silva (Presidente)

---

Profa. Dra. Angélica Amato Amorim

---

Profa. Dra. Miriam da Silva Wanderley

---

Profa. Dra. Ingrid de Oliveira e Silva

---

Prof. Dr. Gustavo Bruno Mota

*Dedico ao meu esposo Lair Gabriel, e aos meus amados filhos Pedro Vítor, João Gabriel e Maria Isabel, razão de minha busca em ser alguém melhor. Vocês reabastecem meu coração de esperanças e felicidades!*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por permitir minha evolução, dar força interior para superar as dificuldades e fazer pulsar em meu coração a felicidade e fé nas minhas conquistas.

A Nossa Senhora Maria Santíssima, por nos cobrir com seu manto sagrado e carregar no colo nos momentos de aflição, passando na frente de todos os obstáculos.

A toda minha família, principalmente aos meus pais Márcio e Orávia, meus irmãos Marcelo e Larissa, meu cunhado Zanda e sobrinhos Rafael e Felipe; minha Sogra querida e família, Jihana, Silvio e sobrinhos Lucas e Beatriz. A todas minhas tias, em especial Viça e Anna Eliza. Vocês sempre me apoiaram e torceram pelo meu sucesso com motivação para enfrentar todas as dificuldades. Obrigada pelo amor que me dedicam sempre.

A minha orientadora, Profa. Dra. Alzira Amélia Martins Rosa e Silva, pela oportunidade de aprendizado, crescimento humano e científico, por todo conhecimento transmitido, pela atenção, amizade, apoio e dedicação durante todo período de orientação e sempre presente.

Aos muitos amigos, que perto ou longe, sempre contribuíram para minha formação e estão ao meu lado, tanto nos momentos de dificuldades como de felicidade.

Aos amigos de pós-graduação, foram poucos momentos neste ciclo, mas aprendizados eternos, obrigado pela parceria sempre; Ingrid, Gustavo, Dany Kaiser.

A Dany Cris, linda, querida e amiga! Obrigada por tudo, pela amizade, pela ajuda em todos os momentos de socorro, pela boa convivência em todos estes anos! Você é o nosso ouro, presente de Deus conviver com você!

Ao Laboratório de Biologia Molecular da UnB, Prof. Dr. Fernando Araripe e a Profa. Dra. Loise Pedrosa, por permitir a realização dos experimentos de PCR e por toda a ajuda prestada.

Ao Laboratório Cenatte Embriões, pela parceria em desenvolvimento deste projeto e apoio técnico sempre que precisamos.

Ao Frigorífico Frigonildo por permitir a coleta e realização dos experimentos.

A Universidade de Brasília pela oportunidade de crescimento e aprendizado.

A FAP-DF PRONEX, pela parceria e contribuição financeira para o desenvolvimento de pesquisas.

*Não importa quanto à vida possa ser ruim,  
sempre existe algo que você pode fazer, e  
triunfar. Enquanto há vida, há esperança.*

*Stephen Howking*

## RESUMO

A produção de embriões *in vitro* é uma biotécnica importante para a reprodução e constitui-se como ferramenta valiosa para estudos de interações de gametas e/ou embriões e, com isso, torna-se cada vez mais excelente modelo não somente para averiguações sobre aspectos sanitários, como também relacionados a processos tóxicos e interações presentes no ambiente *in vitro*. O objetivo deste estudo foi testar e analisar o efeito dos diferentes meios de maturação oocitária *in vitro* (MEMB e MEMO) associados ou não FSH em concentrações de 1 e 10ng/ml, sobre a produção de blastocistos bovinos e a expressão de genes relacionados a competência e metabolismo embrionário (*GLUT1*, *GLUT4*, *PDH*, *G6PDH*, *GAPDH*, *COX2*, *CDX*, *HSP70*, *BAX* e *BCL2*). Em todos os experimentos, oócitos foram obtidos de abatedouro, coletados de vacas adultas e maturados em meio controle (TCM199) e meios testes (MEMO, MEMO+1FSH, MEMO+10FSH, MEMB, MEMB+1FSH, MEMB+10FSH). No Experimento 1, os oócitos foram fertilizados e cultivados até o estágio de blastocisto, avaliando e correlacionando a adição de FSH com 1ng/mL ou 10ng/mL nos meios MEMB e MEMO. No experimento 2, avaliou-se a expressão dos genes *GLUT1*, *GLUT4*, *PDH*, *G6PDH*, *GAPDH*, *COX2*, *CDX*, *HSP70*, *BAX* e *BCL2* em embriões oriundos da maturação em meios diferentes suplementados ou não com FSH (1 ou 10ng/mL). No experimento 1, os resultados demonstraram que a dose de FSH 10ng/mL no meio MEMO+10FSH diminui a produção de embriões; e nos meios MEMO e MEMO+1FSH a produção de embriões é a mesma. Nos meios MEMB com 1FSH e 10FSH não houve diferença na produção de embriões. Já no meio MEMB sem FSH a produção de embriões foi igual ao do grupo controle TCM199. A expressão de *GLUT4*, *GLUT1*, *PDH*, *COX2* e *BAX* em embriões maturados em meios de maturação controle e nos grupos de meios definidos não foi diferente. O gene *G6PDH* foi expresso em baixa abundância nos meios TCM199, MEMB+FSH e MEMO. Nos meios MEMB e MEMO+FSH ocorre um aumento do gene *G6PDH*, sendo estes semelhantes. A abundância de *GAPDH* nos meios TCM199 e MEMB+FSH é menor; e nos meios MEMB, MEMO e MEMO+FSH é maior. Nos genes *HSP70* não há significância entre MEMB e MEMB+FSH, e sim entre MEMO e MEMO+FSH. Nos genes *CDX* apenas o MEMB está elevado, o MEMO não é detectado, e no MEMO+FSH foi pouco expresso. Em relação ao *BCL2* o TCM199 foi o mais abundantemente expresso e semelhante aos



meios MEMO e MEMO+FSH. Já com os meios MEMB e MEMB+FSH são poucos expressos. Concluiu-se que a produção de embriões no meio MEMO foi menor que nos outros tratamentos; e o meio MEMB produz a mesma taxa de embriões que o grupo controle. A adição de FSH aos meios de maturação diminui a produção de embriões no MEMB, e leva, na maioria das vezes baixa expressão de marcadores de competência.

Palavras- chave: maturação *in vitro*, oócito, embrião bovino, marcadores moleculares, FSH, cumulus-oophorus.

## ABSTRACT

The production of *in vitro* embryos is an important biotechnical technique for reproduction and it constitutes a valuable tool for studies of interactions of gametes and / or embryos and, therefore, it becomes increasingly an excellent model not only for check ups concerning sanitary aspects, but also when it is related to toxic processes and actual interactions in the *in vitro* environment. The objective of this study was to test and analyze the effect of different oocyte maturation mediums *in vitro* (MEMB and MEMO) either associated or not FSH at concentrations of 1 and 10 ng / ml, on the production of bovine blastocysts and the expression of genes related to competence and embryonic metabolism (*GLUT1*, *GLUT4*, *PDH*, *G6PDH*, *GAPDH*, *COX2*, *CDX*, *HSP70*, *BAX* and *BCL2*). In all experiments, oocytes were obtained from a slaughterhouse, collected from adult cows and matured in control medium (TCM199) and medium tests (MEMO MEMO + 1FSH, MEMO + 10FSH, MEMB, MEMB + 1FSH, MEMB + 10FSH). In Experiment 1, the oocytes were fertilized and cultured up to the blastocyst stage, assessing and correlating the addition of FSH with 1 ng / ml or 10 ng / mL in MEMB and MEMO mediums. In experiment 2, the expression of *GLUT1* gene, *GLUT4*, *PDH*, *G6PDH*, *GAPDH*, *COX2*, *CDX*, *HSP70*, *BAX* and *BCL2* was evaluated in embryos from maturation in different medium either supplemented or not with FSH (1 or 10 ng / mL) . In experiment 1, the results demonstrated that the FSH dose of 10 ng / ml in the medium MEMO + 10FSH decreases the production of embryos; and in the mediums MEMO and MEMO + 1FSH the production of embryos is the same. In the MEMB medium with 1FSH and 10FSH there was no difference in embryo production. But in the MEMB medium without FSH, the embryo production was the same as the one in the TCM199 control group. The expression of *GLUT4*, *GLUT1*, *PDH*, *COX2* and *BAX* in embryos matured in control maturation medium and defined medium groups was no different. The *G6PDH* gene was expressed in low abundance in TCM199 MB + FSH and MEMO mediums. In the MEMB and MEM + FSH mediums, an increase of the *G6PDH* gene happens, and they are similar. The abundance of *GAPDH* in TCM199 and MEMB + FSH mediums is lower; and in the MEMB, MEMO and MEMO + FSH mediums is higher. In the *HSP70* genes there is no significance between MEMB and MEMB + FSH, but there is some difference between MEMO and MEMO + FSH. In the *CDX* genes, only the MEMB is high, MEMO is not detected, and the MEMO + FSH was

little expressed. Concerning the *BCL2*, the TCM199 was the most expressed and it was similar to the MEMO and MEMO + FSH mediums. But with the MEMB and MEMB + FSH mediums, they are little expressed. It was concluded that the production of embryos in the MEM medium was lower than the other treatments; and the MEMB medium produces the same rate of embryos than that of the control group. The addition of FSH to the maturation mediums decreases the production of embryos in the MEMB and leads in most cases to low expression of competence markers.

**Keywords:** *in vitro* maturation, oocyte, bovine embryo, molecular markers, FSH, *cumulus-oophorus*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vias do metabolismo intermediário relevantes ao desenvolvimento das células embrionárias.

Figura 2: Aspecto morfológico de oócitos cultivados em meio controle de laboratório (TCM-199) contendo 10% de soro de vaca em estro e FSH (100ng), após 24 horas de cultivo.

Figura 3: Aspecto morfológico de oócitos cultivados em meio MEMB após 24 horas de cultivo.

Figura 4: Aspecto morfológico de oócitos cultivados em meio MEMB suplementado com 1 ng de FSH após 24 horas de cultivo.

Figura 5: Aspecto morfológico de oócitos cultivados em meio MEMB suplementado com 10 ng de FSH após 24 horas de cultivo.

Figura 6: Embriões produzidos *in vitro*, sete dias (D7) após a FIV.

Figura 7: Embriões produzidos *in vitro*, sete dias (D7) após a FIV.

Figura 8: Embriões produzidos *in vitro*, sete dias (D7) após a FIV. Maturação em meio teste MEMO+10FSH (aumento 10X).

Figura 9: Porcentagem de formação de blastocisto após maturação oocitária *in vitro* nos meios testados.

Figura 10: A expressão do gene GLUT1, transportador de glicose em embriões, produzidos em oócitos maturados em diferentes meios de cultivo.

Figura 11: A expressão do gene GLUT4, transportador da glicose em embriões, produzidos a partir de oócitos maturados em diferentes meios de cultivo.

Figura 12: A expressão do gene da enzima piruvato desidrogenase (PDH) do metabolismo intermediário nos meios de maturação *in vitro*.

Figura 13: A expressão do gene de metabolismo intermediário G6PDH nos meios de maturação *in vitro*.

Figura 14: A expressão do gene de metabolismo intermediário GAPDH nos meios de maturação *in vitro*.

Figura 15: A expressão do gene de competência embrionária COX2 nos meios de maturação *in vitro*.

Figura 16: A expressão do gene de competência embrionária CDX nos meios de maturação *in vitro*.

Figura 17: A expressão do gene de competência embrionária HSP70 nos meios de maturação *in vitro*.

Figura 18: A expressão do gene de apoptose celular BAX nos meios de maturação *in vitro*.

Figura 19: A expressão do gene de apoptose celular Bcl-2 nos meios de maturação *in vitro*.

Figura 20: Consumo de glicose, piruvato e oxigênio mensurados nas diferentes fases de desenvolvimento embrionário pré-implantação (mensuração feita em embriões isoladamente) durante o cultivo *in vitro*.

Figura 21: Vias de entrada dos ácidos graxos na mitocôndria para a beta-oxidação.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela de primers - Desenhos dos *primers* e o código *GenBank* para cada transcrito da espécie *Bos taurus*.

Tabela 2: Percentagem de embriões oriundos de maturação *in vitro* em meio controle e meios quimicamente definidos.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI: anáfase 1  
ANOVA: análise de variância  
ATP: adenosina trifosfato  
ATPC: ATP citrato liase  
Bax: proteína X associada à família Bcl-2  
Bcl-2: B cell lymphoma/leukaemia-2  
BSA: albumina sérica bovina  
cAMP: adenosina monofosfato cíclico  
CCOs: complexo *cumulus*-ooócito  
CIV: cultivo *in vitro*  
cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar  
DNA: ácido desoxirribonucléico  
ETC: estresse térmico celular  
FIV: fertilização *in vitro*  
FSH: hormônio folículo estimulante  
GAPDH: Gliceraldeído fosfato desidrogenase  
G6PDH: glicose 6-fosfato desidrogenase  
GLUT1: Transportador facilitado de glicose do tipo I  
GLUT4: Transportador facilitado de glicose do tipo 4  
HSP: proteínas de choque térmico  
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
INPI: Instituto Nacional de Pesquisa e Inovação  
LH: hormônio luteinizante  
MI: metáfase 1  
MII: metáfase 2  
MCI: massa celular interna  
MEMB: meio base de maturação *in vitro*  
MEMC: meio completo de maturação *in vitro*  
MEMO: meio completo de maturação *in vitro*  
MIV: maturação *in vitro*  
mL: mililitros  
mRNA: ácido ribonucléico mensageiro

NADPH: fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzido

ng: nanogramas

P4: progesterona

PBS: solução tampão fosfato

PCR: reação em cadeia da polimerase

PDH: complexo enzimático piruvato desidrogenase

PIB: produto interno bruto

PIV: produção *in vitro* de bovinos

PG: prostaglandinas

PVA: álcool polivinílico

PPP: penstose fosfato

PVA: álcool polivinílico

qPCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNA: ácido ribonucléico

SFB: soro fetal bovino

SVC: soro de vaca no cio

TI: telófase 1

UnB: Universidade de Brasília

VG: vesícula germinativa

VGBD: quebra da vesícula germinativa

µg: microgramas

µL: microlitros



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	22
2.1 Produção de embriões <i>in vitro</i> .....	26
2.2 Expressão gênica em embriões bovinos .....	31
2.3 Marcadores moleculares de embriões .....	32
2.3 .1 Morte celular e apoptose em embriões .....	34
2.3 .2 Genes de estresse térmico celular .....	38
2.3 .3 Prostaglandinas COX e CDX .....	40
2.3 .4 Metabolismo intermediário de complexo <i>cumulus</i> oócitos e embriões .....	43
2.4 Resultados promissores do laboratório .....	45
3 OBJETIVOS.....	48
3.1 Objetivos específicos.....	48
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
5 RESULTADOS.....	57
6 DISCUSSÃO.....	70
7 CONCLUSÕES .....	88
8 REFERÊNCIAS.....	89

## 1 INTRODUÇÃO

O folículo ovariano, unidade funcional e fundamental do ovário de mamíferos, possui função gametogênica e esteroidogênica e é composto por três tipos celulares: o oócito (célula germinativa) envolto por células somáticas (células da granulosa e da teca), sendo as células somáticas responsáveis pela produção de esteróides sexuais e auxiliando na maturação do oócito. O oócito está firmemente aderido às células da granulosa que o circundam e são chamadas de células do *cumulus*, compondo assim o *complexo cumulus oócito* (CCO) (1). *In vivo*, o oócito permanece estacionado no início da primeira meiose até a puberdade (2).

Na puberdade, a ação das gonadotrofinas e de outros hormônios de ação endócrina e parácrina recrutam e seleciona folículos ovarianos, o que leva à maturação e ovulação de um oócito competente por ciclo (3), porém *in vitro* o mesmo não ocorre, sendo que, através das técnicas hoje existentes podemos maturar uma grande quantidade de oócitos almejando o aumento das taxas de gestação e melhora da qualidade genética animal. Assim, a elaboração de meios de maturação *in vitro* (MIV) que melhorem as biotécnicas reprodutivas para alcançar maior qualidade oocitária é de fundamental importância na produção de embriões capazes de se implantar e gerar fetos saudáveis.

A maturação do oócito é feita em dois passos interrelacionados e integrados: a maturação nuclear e a citoplasmática. A primeira corresponde à finalização da meiose (2) e a última envolve a redistribuição das organelas citoplasmáticas, rearranjo do citoesqueleto e maturação molecular (4). A maturação molecular é caracterizada pela transcrição de genes e a tradução de proteínas necessárias aos processos celulares do oócito e ao desenvolvimento embrionário inicial, portanto, para determinação da base molecular da maturação oocitária podem ser utilizadas técnicas que avaliam a expressão diferencial dos genes das mais variadas funções celulares (5), incluindo o metabolismo intermediário. Além disso, sabe-se que o metabolismo intermediário é uma das possíveis respostas para a maturação oocitária com qualidade, englobando a progressão da meiose e da maturação citoplasmática (6; 7; 8).

Diversos trabalhos têm sido realizados visando aperfeiçoar os sistemas de maturação, fertilização e cultivo embrionário (9; 10;11;12), tendo como objetivos

finais aumentar não apenas o número, mas também o potencial de desenvolvimento dos embriões. A maturação oocitária é uma etapa crítica no processo da produção *in vitro* de embriões (PIV). Neste contexto, um dos desafios da pesquisa é mimetizar em cultivo as condições originais do desenvolvimento oocitário no ambiente intrafolicular, quer seja em relação à reprodução do ambiente folicular original ou quanto à dinâmica temporal dos eventos (13).

A progressão espontânea da meiose decorrente da remoção do *complexo cumulus oócito* do folículo é uma das limitações para o controle da sincronia entre a maturação citoplasmática e nuclear, uma vez que em condições de cultivo o processo de maturação é completado em 22 a 24 horas, de forma muito diferente do que acontece naturalmente no ovário. A maturação nuclear corresponde à finalização da meiose e, a citoplasmática é o acúmulo de RNAs e proteínas que sustentarão o embrião até a ativação do genoma embrionário. Folículos de três a quatro mm de diâmetro, normalmente utilizados na PIV, levariam, a uma taxa média de crescimento de 1,0 a 1,5 mm/dia, em torno de quatro dias para atingir o tamanho pré-ovulatório (14). Enquanto que a qualidade intrínseca do oócito, que é adquirida antes da maturação nuclear, garante-lhe a competência para gerar embriões, o oócito e os sistemas de cultura *in vitro* de embriões determinam a qualidade dos blastocistos gerados. Relatos de estudos *in vivo* indicam que enquanto a meiose está bloqueada, pode ocorrer a progressão da maturação citoplasmática (14).

No entanto, durante a maturação *in vitro*, a retirada do oócito do folículo faz com que a meiose seja retomada precocemente, antes que a maturação citoplasmática tenha sido completada. É por esta razão que se buscam sistemas de cultura que retardem a maturação nuclear. Com isto é obtido um tempo adicional para que as modificações citoplasmáticas e moleculares aconteçam e assim seja alcançada uma maior sincronia do processo maturacional oocitário como um todo e a competência para o desenvolvimento seja atingida.

Entretanto, a ação dos hormônios hipofisários gonadotróficos [hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH)] sobre o folículo ovariano e sobre a maturação do oócito é clássica, e muitas informações fisiológicas precisam ser elucidadas a respeito da ação desses hormônios sobre o CCO *in vivo* e *in vitro* (15;16;17).

A ação do FSH *in vivo* e *in vitro* sobre a finalização da meiose é bastante evidente, mostrando que a presença de concentrações elevadas desse hormônio no meio de MIV aumenta significativamente as taxas de maturação nuclear (16).

A atividade metabólica oocitária também está correlacionada com a competência do oócito, pois o nível dos substratos energéticos afeta profundamente a maturação nuclear e molecular. Ao aumentar a concentração de glicose no meio, por exemplo, induz-se a uma maior taxa de maturação nuclear e citoplasmática (6) e o FSH aumenta a metabolização da glicose e aumenta a atividade da enzima hexocinase (primeira enzima da rota glicolítica), sendo esse um dos possíveis mecanismos pelos quais o FSH aumenta a taxa de maturação nuclear *in vitro* (16;18). Portanto, as ações metabólicas do FSH podem ser ao menos em parte, associadas ao aumento da produção de embriões *in vitro*.

Recentemente obtivemos em nosso laboratório resultados de capital importância, uma vez que desenvolvemos meios de cultura e sistemas de maturação *in vitro*. Estes meios definidos são capazes de bloquear temporariamente a retomada da meiose dos *complexos cumulus oócitos* (CCOs), na ausência de inibidores sintéticos (10; 11). Tal bloqueio é completamente reversível e o cultivo de oócitos neste meio definido promove uma aceleração da maturação citoplasmática (12). Além disso, este sistema mantém as células do *cumulus oophorus* dos CCOs com alto potencial de síntese de hormônios esteróides como observado em um folículo dominante *in vivo* (19). Portanto, mimetizando fisiologicamente o folículo em crescimento, este sistema de cultivo, incluindo a formulação do meio de cultura são objetos de uma patente depositada pelo nosso laboratório da Universidade de Brasília junto ao Instituto Nacional de Pesquisa e Inovação (INPI) sob o número 012080000612 (ROSA E SILVA, A. A. M.; OLIVEIRA E SILVA, I.; VASCONCELOS, R. B.; GULART, L. V. M.; SILVA, L.G.R.E).

Por envolver a produção *in vitro* de embriões na mesma quantidade dos obtidos com formulações convencionais, porém com qualidade e reprodutibilidade melhoradas, este sistema apresenta interesse para diferentes segmentos industriais, como a agroindústria e interesses comerciais com relação aos animais de grande produção de carne e leite quando se refere à aplicação de alta tecnologia aos animais em risco de extinção e também para as clínicas de fertilização humana.

Meios de cultivo adequados permitem o estudo de fatores determinantes da aquisição de competência e metabolismo dos CCOs. A presença de soro, muito

comumente usado em meios de cultura comerciais, é um fator determinante para alterações de funções fisiológicas *in vitro*, como a luteinização das células foliculares (20). Meios definidos e ausentes de soro são alternativas viáveis para preservar a fisiologia das células, além de diminuir a interferência de fatores não conhecidos presentes no soro.

Um dos parâmetros utilizados para determinação da competência do oócito são as taxas de finalização da meiose *in vitro* e sabe-se que essa é fortemente influenciada pela presença de FSH (16). Além disso, sabe-se que a competência do embrião pode ser inferida pela sua competência metabólica. Assim, o estudo do perfil metabólico dos embriões ajudará no entendimento dos processos fisiológicos relacionados à competência embrionária e na determinação dos efeitos dos componentes do meio definido desenvolvido e patenteado pelo nosso laboratório na busca de biotécnicas para melhorar as técnicas de maturação e, conseqüentemente, melhorar as taxas de produção *in vitro* de embriões.

Resultados recentes em nosso laboratório indicam que a manipulação da fórmula original e outros meios de cultura simplificados, são capazes de bloquear a maturação nuclear e produzir o mesmo número de embriões que os obtidos com os melhores meios disponíveis no mercado comercial (11). Contudo a obtenção de mesmo número de embriões não indicaria por si só um avanço da técnica, a não ser que estes embriões fossem avaliados por marcadores moleculares de competência citados na literatura.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

O agronegócio brasileiro representa 22,74% do produto interno bruto (PIB) do país (21) e a pecuária bovina contribui de forma ativa nesse cenário. O Brasil possui o maior rebanho comercial bovino do mundo com mais de 185 milhões de cabeças (22), dentre os quais se destacam as raças de corte, consagrando o Brasil como maior exportador de carne dessa espécie. Devido ao interesse crescente em se obter uma exploração maior do potencial genético de fêmeas, a produção *in vitro* de embriões (PIV) vem sendo aplicada para o aumento na produção do número de embriões destinados à transferência comercial. O Brasil é o maior produtor mundial com 366.517 embriões produzidos, cerca de 70% do total mundial (23). A técnica é capaz de superar problemas como os de infertilidade de vacas com alto valor econômico (24) e proporcionar aumento de ganho genético através da multiplicação de bovinos com grande potencial genômico (25).

Na produção *in vivo* de embriões bovinos, aproximadamente 80% dos oócitos ovulados desenvolvem-se até blastocisto, enquanto na produção *in vitro* (PIV) apenas 40% atingem esse estágio (26). O ambiente de maturação *in vitro* (MIV) influencia essa baixa taxa, uma vez que na PIV os oócitos utilizados são menos eficientes que os oócitos maturados *in vivo* (27; 28). O que pode ser causado, parcialmente, pela utilização de oócitos de baixa qualidade (29; 27; 30). O motivo pelo o qual alguns oócitos apresentam qualidade inferior ainda é pouco conhecido, uma possível explicação é que os mesmos estão mais suscetíveis a sofrer apoptose (31).

A maturação oocitária *in vitro* (MIV) é a etapa determinante para o sucesso da técnica da PIV. A não aquisição da competência oocitária nesta fase reflete-se principalmente no final do processo, diminuindo a taxa de produção de blastocistos. Apesar do grande avanço na PIV de embriões, os resultados de MIV relacionados ao desenvolvimento, taxas de sobrevivência e implantação embrionárias são inferiores quando comparados à maturação *in vivo* (32; 27; 33; 34; 35). Portanto, avaliar e melhorar a qualidade oocitária durante a maturação torna-se fator determinante para o sucesso da técnica.

Diversas biotécnicas ligadas à reprodução animal têm sido desenvolvidas e aprimoradas no sentido de aumentar a eficiência reprodutiva e, conseqüentemente, maximizar a produção de animais geneticamente superiores, visando o aproveitamento deste material genético para obtenção do maior número de descendentes em um curto período de tempo (36). Os oócitos devem crescer e sofrer várias mudanças ultra-estruturais e bioquímicas, tornando-se competentes para reiniciar e completar a maturação meiótica (37).

A maturação nuclear completa ocorre com a ativação do oócito em estágio de vesícula germinativa (VG), incluindo o rompimento da VG até a segunda parada meiótica em metáfase II (MII). Os oócitos passam pelos estágios de diacinese, metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI) e então rapidamente passam para MII. Como resultados dessas mudanças, os cromossomos homólogos se separam com a formação do primeiro corpúsculo polar. Esse corpúsculo polar contém uma pequena parte de citoplasma e a metade dos cromossomos homólogos. Logo após, os cromossomos do oócito ingressam na segunda divisão da meiose formando-se a placa metafásica II. Neste momento, o oócito é conhecido por oócito secundário e pára novamente a divisão celular, permanecendo neste estágio (MII) até ser fertilizado pelo espermatozóide ou sofrer atresia (37).

As diversas mudanças que ocorrem no citoplasma durante o desenvolvimento e maturação dos oócitos são essenciais para capacitar e atingir o desenvolvimento da competência meiótica, fertilização e desenvolvimento embrionário. Os oócitos com maturação nuclear normal, em tempo regular, mas que possuem uma assincronia entre maturação citoplasmática e nuclear, não serão fecundados ou não conseguir avançar no seu desenvolvimento embrionário (38).

A maturação oocitária é definida como o reinício e término da primeira divisão meiótica, do estágio de quebra da vesícula germinativa até a fase de metáfase II, acompanhada da maturação citoplasmática necessária para a fertilização e desenvolvimento embrionário (39).

A maturação *in vitro* de oócitos é uma importante técnica reprodutiva que pode gerar oócitos maduros capazes de sustentar o desenvolvimento embrionário (40). As condições de maturação *in vitro* dos oócitos bovinos são essenciais para a produção de embriões (41).

Diferente do que ocorre *in vivo*, os oócitos utilizados para a PIV são normalmente obtidos de folículos de 2 a 8 mm, que não são expostos às mudanças

pré-ovulatórias do ambiente folicular, e são menos competentes do que os oócitos de folículos acima de 8 mm (42).

Oócitos maturados *in vitro* têm limitações, principalmente relacionadas ao potencial de desenvolvimento de embriões, quando comparados com oócitos maturados *in vivo* (27).

Apesar dessa limitação, a MIV é uma técnica que abrange uma população muito variada de oócitos coletados de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, sendo a eficiência da técnica limitada pela qualidade e competência de desenvolvimento do oócito, baseada principalmente em sua capacidade de ser fertilizado e desenvolver um embrião (43;44).

Existem muitos fatores que influenciam o processo de MIV. O desafio fundamental é compreender o que constitui a competência para o desenvolvimento do oócito, incluindo o papel que o ambiente folicular ovariano desempenha na sua evolução para o pleno potencial de desenvolvimento (45).

Vários constituintes têm sido adicionados ao meio para aumentar a taxa de maturação, tais como: Soro Fetal Bovino (SFB), soro de fêmea em estro, hormônios, líquido folicular e fatores de crescimento e ainda co-cultivo com células do *cumulus* e células da granulosa (46).

A maturação dos complexos *cumulus*-oócitos (COC) inclui modificações citoplasmáticas, manutenção de um estoque de proteínas e transcritos e expansão das células do *cumulus*, que podem ser influenciadas pelas condições de cultivo, quando submetidos à MIV (47;48). As condições de cultivo comumente utilizadas para a maturação *in vitro* envolvem o uso de 10% de soro e 20% de tensão atmosférica de oxigênio. O soro de vaca em cio (SVC) é rotineiramente utilizado como suplementação proteica na MIV, e o SFB no cultivo *in vitro* (CIV) de embriões (49). Todavia, o soro possui compostos indefinidos e, quando utilizado no cultivo embrionário, altera a criotolerância e a abundância relativa de transcritos (30). De forma similar, observa-se que o uso de alta tensão de O<sub>2</sub> no cultivo embrionário altera a abundância relativa de mRNA em embriões (50). Contudo, pouco se sabe dos efeitos dessas condições na MIV sobre o estoque de transcritos armazenados no citoplasma do oócito imaturo.

A suplementação do meio de maturação *in vitro* com fatores de crescimento presentes no ambiente folicular vem sendo utilizada no intuito de tornar o ambiente mais parecido com o que ocorre fisiologicamente. A adição de fatores de



crescimentos durante a MIV, por exemplo, melhora a maturação oocitária, expansão das células do cumulus, taxa de fertilização e desenvolvimento embrionário (51; 52). A complementação do meio com fator de crescimento altera positivamente a fertilização e desenvolvimento embrionários (53; 54), e melhoram a taxa de produção de embriões (55; 56). Na MIV, alguns estudos indicam que o desenvolvimento de blastocistos pode ser alcançado através da adição de fatores ao meio de maturação tais como ácido linoleico (57), leptina (58) e FSH (59).

Meios de maturação com FSH, LH e estradiol e com EGF e IGF-I (juntos ou não) foram testados (59) com grande sucesso. As taxas de maturação foram 46,6% (controle: meio de cultura, piruvato e antibióticos), 74,7% (controle + hormônios), 63,2% (controle + EGF), 64,7% (controle + IGFI) e 81,0% (controle + EGF + IGF-I).

Van de Leemput (60) e colaboradores verificaram que oócitos obtidos de maturação *in vivo*, após estímulo hormonal com FSH e GnRH, são mais competentes em se desenvolver até blastocistos do que os maturados *in vitro* (61), o que sugere que a MIV deve determinar condições subótimas para o desenvolvimento de oócitos imaturos.

Atualmente o meio TCM-199 é considerado o meio padrão para a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos e é utilizado na maioria dos protocolos de MIV, modificado conforme a rotina do laboratório (12).

Quando suplementado com hormônios ou fatores de crescimento, melhora a maturação citoplasmática. Além disto, o TCM-199 apresenta efeito na maturação oocitária que estimula a divisão celular e conseqüentemente o melhor desenvolvimento embrionário (12). Porém é um meio complexo pela presença, na maioria das vezes de soros, sendo assim não é possível relacionar cada componente com sua função (20).

O grande desafio da pesquisa aplicada é produzir inovação no campo da reprodução baseando-se nos eventos até aqui explorados. O potencial das técnicas de produção *in vitro* de embriões possui baixa efetividade, considerando-se as taxas médias de embriões (20 a 50%) e gestações (30 a 40%) obtidas em bovinos (9). Portanto, podemos partir da premissa de que o oócito em cultivo não consegue expressar sua máxima competência quando comparado ao *in vivo*.

Em boa parte dos meios de cultura utilizados nos estudos supracitados há a suplementação com soro fetal que contém uma série de componentes não

conhecidos e/ou não quantificados que impedem o entendimento da ação de cada item a ser suplementado e que, também, podem trazer alterações fisiológicas ao complexo cumulus–oócito (CCO), como por exemplo, alteração dos padrões de expressão gênica (23).

Com os meios de maturação de oócitos formulados, o nosso laboratório tem obtido resultados importantes para a pesquisa; indicando que talvez a ausência de fatores de crescimento e hormônios no meio, que nesse ponto da pesquisa originou o meio base, MEMB, meio reserva de domínio, e o meio completo MEMC patenteado, também é capaz de inibir a progressão da meiose. Porém, ao observar-se que a ausência de hormônios foi suficiente para produzir a mesma quantidade de embriões que o meio controle, contendo soro independentemente da presença ou ausência de FSH suscitou novos questionamentos (11) e um deles especificamente estava ligado a seguinte questão: até que ponto a simplificação do MEMC ou do MEMB, mais simples seria capaz de originar embriões uma vez que, os resultados obtidos apontavam para uma inibição da maturação nuclear associada a uma maturação citoplasmática em curso (10;11).

Ainda, outros questionamentos surgiram com o intuito de averiguar-se o potencial de produção de embriões a partir de oócitos maturados em meios cada vez mais simples, o chamado MEMO, ou seja, Meio Origem, que é constituído apenas do meio diluente e antibióticos.

## 2.1 PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO*

A reprodução é uma das etapas fundamentais da vida de qualquer ser vivo e permite a passagem das características aos seus descendentes, visando a variabilidade genética da população e a perpetuação das espécies. Os gametas sexuais são parte essencial nesse processo e a manutenção de sua viabilidade depende do ganho e do amadurecimento de sua capacidade biológica.

A ativação do genoma embrionário de bovinos só ocorre no estágio de oito células o que caracteriza a transição materno – zigótica. Então a sobrevivência do embrião nas fases iniciais depende da qualidade do oócito e, após a ativação do genoma embrionário, dependerá de sua capacidade de se adaptar às condições *in*

*vivo* ou *in vitro* utilizando suas reservas endógenas ou captando substratos externos (24). Nos oócitos as vias anabólicas, como a síntese de proteínas, de DNA e de RNA e síntese de reservas energéticas na forma de triglicerídeos e glicogênio, estão ativas para suprimento não apenas das necessidades dessa célula como também do embrião no período pré-implantação, pois até as fases iniciais de clivagem a transcrição de genes do embrião é limitada e há dependência do ambiente *in vivo* ou *in vitro* e das reservas energéticas que são acumuladas durante o período de maturação oocitária (24; 25; 26).

Um bom aporte de nutrientes é essencial para o excelente desenvolvimento de células e indivíduos. Encontrar um equilíbrio de nutrientes desde o cultivo *in vitro*, o ambiente intra-uterino até a fase adulta é fundamental, pois isso influencia nas características fenotípicas que serão percebidas nas células e nos indivíduos na fase adulta. Ao mesmo tempo, observa-se como a linha que separa a boa nutrição da carência de nutrientes em determinadas situações fisiológicas é tênue. Por isso, uma análise detalhada do perfil metabólico e traçar correlações entre consumo/produção de determinados nutrientes e a viabilidade celular é fundamental para atingir o objetivo de melhorar os sistemas de cultivo *in vitro*, permitindo o excelente aporte de nutrientes que levarão o embrião a viabilidade e a competência.

Entretanto, pouco avanço do conhecimento do perfil metabólico e competência de embriões de várias espécies têm sido alcançados. Ainda há necessidade de muitos estudos que determinem as características de competência e metabólicas individuais de cada embrião e sua correlação com viabilidade embrionária e geração de gestações (27). Com relação a embriões bovinos, há uma grande gama de estudos propondo marcadores moleculares, utilizando metodologias invasivas, ou seja, que destruirão as estruturas celulares e impossibilitarão a transferência e o estudo *in vivo*. Logo, o advento de marcadores não invasivos que permitam a identificação do perfil metabólico de embriões individuais pode permitir o avanço das tecnologias reprodutivas.

Sendo assim, aqui se encontram questões que devem ser respondidas e que permitirão o desenvolvimento de técnicas para melhorar as condições *in vitro* e identificar marcadores não invasivos de identificação de embriões viáveis, tendo consciência de que o ambiente do meio de cultivo já é, em si mesmo, um fator estressante para ao embrião (28) e que essas limitações devem ser transpostas visando à melhora das biotécnicas reprodutivas (27).

Estudos indicam que durante a formação dos blastocistos, ocorrem algumas mudanças metabólicas que elevam a taxa metabólica como um todo. Há o aumento na captação e utilização de piruvato e glicose e produção de lactato, denotando elevação das necessidades energéticas, portanto, maior velocidade das reações para síntese de ATP e de outros compostos importantes às funções celulares (29; 30; 31). Em média, para sustentar o processo de formação da cavidade, chamada de blastocele, 86% do ATP provêm da fosforilação oxidativa e 14% da glicólise (32).

A formação da blastocele causa o aumento da atividade da bomba sódio/potássio ATPase ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase), elevando as necessidades energéticas e o consumo de oxigênio. Assim, até a fase de mórula há baixo consumo de oxigênio ( $\text{O}_2$ ); durante a compactação da mórula e formação do blastocisto há aumento de consumo de  $\text{O}_2$  (30). A bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase é responsável por lançar sódio no interior do embrião e que, por osmose, leva a entrada de água, formando a blastocele (33).

É justamente no período de formação do blastocisto que há replicação e aumento no número de cristas das mitocôndrias e aumento da captação de glicose e piruvato (34; 30). Com relação às mitocôndrias observadas no embrião, sabe-se que sua origem é oocitária. Na fase de maturação do oócito e nos estágios embrionários iniciais essas organelas são caracteristicamente imaturas, sendo arredondadas ou ovóides e com poucas cristas internas (35). Iniciam o processo de alongamento de sua estrutura e o aumento do número de cristas internas entre as fases de quatro e dezesseis células, em concordância com dados que mostram que a taxa de oxidação completa (aeróbia) da glicose é de apenas 10% até a fase 16 células e que sobe para 85% nas fases subsequentes (35; 34). Isso pode indicar baixa atividade mitocondrial ou competição por oxidação com outros substratos do meio como, por exemplo, aminoácidos e piruvato, nas fases iniciais de clivagem do embrião (35; 34).

O consumo de boa parte da glicose é feita através da glicólise gerando piruvato, porém como sua capacidade de síntese de ATP é baixa, a maior parte do ATP será produzido pela via oxidativa (36). A rota aeróbia, ou seja, utilizando as vias metabólicas mitocondriais, gera maior número de moléculas de ATP quando comparada à forma anaeróbia, então é provável que uma pequena concentração de glicose totalmente oxidada gere em torno de 90% do total de ATPs necessários para o desenvolvimento dos embriões (34). Além disso, considera-se o baixo número de mitocôndrias e baixa concentração de ATP como marcadores de baixa qualidade do

oócito (34) e isso influenciarão negativamente na capacidade de fertilização e desenvolvimento do embrião.

Com relação ao suporte de proteínas e aminoácidos, estudos com embriões bovinos demonstram que a presença de albumina sérica bovina (BSA) durante o cultivo afeta o desenvolvimento embrionário. A substituição de BSA por ácido polivinílico (PVA), macromolécula não metabolizável, diminui a taxa de clivagem, de formação de blastocistos e o número de células por blastocisto (37). Além disso, altera o perfil de turn over de certos aminoácidos (37), pois a BSA pode ser fagocitada e degradada pelo trofoectoderme gerando um pool de aminoácidos específicos contendo, por exemplo, leucina, lisina e glutamato, (38) que podem estar relacionados com o adequado desenvolvimento embrionário.

Porém, as reservas energéticas de bovinos, sua possível utilização e a interação com outras fontes nutricionais ainda precisam ser melhor elucidadas na tentativa de melhorar as biotécnicas de cultivo embrionário. Também não se sabe quais são as rotas sintéticas que podem ser ativadas *in vitro* gerando um resultado que não corresponde ao encontrado *in vivo* na presença de soro no meio de cultivo (26). No soro há diversos fatores não conhecidos, como por exemplo, fatores de crescimento e lipídios, que podem alterar o perfil metabólico dos embriões, logo isso constitui um fator limitante ao entendimento de como o meio de cultivo interfere na viabilidade metabólica do embrião.

A composição do meio ideal permite o desenvolvimento morfológico e número de células adequado ao estágio do embrião, o nascimento de um filhote após a transferência (29) e minimiza o estresse do cultivo *in vitro* (39). Boa parte dos embriões não sobrevive após a transferência, e os que sobrevivem podem desenvolver anomalias e, até mesmo, gerar fetos grandes para a idade gestacional (28). Isso demonstra que o ambiente *in vitro* faz com que o oócito e, conseqüentemente, o embrião passe por alterações na expressão gênica e na expressão fenotípica de suas características, levando a crer que o ambiente *in vitro* é estressor (8; 28). Desta forma, estudos baseados no perfil metabólico indicarão a capacidade de adaptação que o embrião terá às condições *in vitro*, se o meio de cultura é ideal ao seu desenvolvimento e sua viabilidade após a transferência (40; 39).

No cultivo *in vitro* há aumento da taxa oxidativa que ocorre na mitocôndria e que leva a geração de radicais livres prejudicando o desenvolvimento embrionário

(39). Por isso, há a necessidade de se estudar os meios de cultivo existentes para se obter o meio excelente, visando melhorá-los para obter maior taxa de viabilidade após a transferência (40).

Levando-se em consideração que os oócitos e embriões são mais competentes quando gerados *in vivo* quando comparados aos *in vitro*, verifica-se que os atuais sistemas de cultivo pouco lembram o sistema reprodutor feminino. Metabolicamente falando, o trato uterino tem menores concentrações de substratos energéticos e de oxigênio quando comparado ao *in vitro*. Por exemplo, a concentração de oxigênio *in vivo* ao qual está exposto o embrião é entre 3 e 5% de oxigênio, então quando comparado às concentrações atmosféricas (21%) podemos dizer que o meio *in vitro* é pró-oxidante (41). A temperatura é outro fator importante, pois a temperatura aproximada dos ovários é de 1,5° a 2°C menor que a temperatura corporal, assim a temperatura ideal proposta para diminuir o metabolismo embrionário visando aquisição de competência seria 37°C e não 39° como o utilizado na maior parte dos estudos (42).

Além disso, a influência do meio de cultivo oocitário sobre o desenvolvimento do embrião *in vitro* precisa ser melhor compreendido e, pode-se considerar que ainda não há meios de cultivo cuja efetividade supere os encontrados na literatura e que sejam realmente adequados às necessidades do oócito e do embrião em todas as suas fases de desenvolvimento (29).

Sabe-se que os requerimentos energéticos dos embriões são diferentes ao longo do tempo de desenvolvimento (30) e que a composição dos fluidos uterinos se modifica de forma dinâmica, porém isso não ocorre quando o embrião é cultivado *in vitro* (29). O cultivo *in vitro* deveria mimetizar o que ocorre *in vivo*, inclusive na composição do meio. Observa-se que nos estágios iniciais de clivagem, o embrião suporta meios de cultivo mais simples, contendo aminoácidos e piruvato, e nas fases de mórula e blastocisto há maior tolerância a meios mais complexos (29).

As condições de cultura afetam vários parâmetros como a cinética do desenvolvimento, alocação das células do trofoblasto e do embrioblasto na fase do blastocisto, expressão gênica e metabolismo (42). Assim, os meios de cultivo *in vitro* podem ser considerados subótimo para alguns autores (43) ou excessivo para outros (41).

Além disso, há consideráveis diferenças entre embriões que são gerados *in vitro* quando comparados aos *in vivo*. As diferenças são morfológicas, de

ultraestrutura, sensibilidade a crioinjúria, expressão do genoma, metabolismo, assim como, desenvolvimento fetal e pós-natal (43). Deste modo, se faz necessária a busca por marcadores moleculares, em especial a expressão de mRNAs, que poderiam fornecer fortes indicativos da qualidade embrionária. Apesar de ainda não existir um consenso com relação a(s) qual(is) o(s) melhor(es) marcador(es) de viabilidade embrionária, a quantificação da abundância relativa de mRNAs de embriões tem sido utilizada para a avaliação do ambiente/meios de cultivo *in vitro* (12; 48).

## 2.2 EXPRESSÃO GÊNICA EM EMBRIÕES BOVINOS

O termo expressão gênica refere-se ao processo pelo qual a informação genética contida num gene específico é traduzida em uma proteína específica que exercerá sua função na célula ou fora dela (61). Esse processo se dá por uma cascata de eventos, regulados por ligações de proteínas a uma seqüência regulatória de DNA, que ativam sinais bioquímicos em cadeia, resultando na ativação ou repressão de diversos genes. Estes coordenam o ciclo celular através de fatores de crescimento, hormônios, citocinas, fatores de transcrição e enzimas de controle de replicação do DNA (83). O genoma funcional que resulta deste conjunto de fatores é responsável por explorar o papel de numerosos ligantes e receptores que convergem sobre a regulação transcricional (84). Os genes expressos podem ser constitutivos (*housekeeping*) ou induzidos. Os constitutivos são expressos em todas as células e responsáveis por funções comuns, como os genes de tRNA e rRNA, proteínas ribossômicas ou proteínas próprias do metabolismo celular. Os induzidos correspondem àqueles responsáveis por funções específicas, sendo expressos a partir de um determinado estímulo (85).

O desenvolvimento pré implantacional do embrião bovino é regulado pela informação genômica materna acumulada durante a oogênese e depende também dos transcritos derivados da ativação do genoma embrionário (86). A expressão gênica tem importância fundamental na coordenação dos mecanismos homeostáticos e metabólicos durante o desenvolvimento e seu controle preciso durante a fase pré implantacional é particularmente importante. As etapas iniciais do

desenvolvimento, incluindo o tempo em que ocorre a primeira clivagem, ativação do genoma embrionário, compactação e formação do blastocisto podem ser afetadas pelas condições e meios de cultura.

Condições sub-otimas de cultura durante a maturação *in vitro* e o cultivo embrionário podem resultar em um marcado decréscimo na qualidade dos blastocistos produzidos e afetar a viabilidade do embrião após a transferência, bem como sua capacidade de chegar a termo e se desenvolver em um animal saudável. Procedimentos *in vitro*, tais como a PIV e a clonagem por transferência nuclear somática também tem sido correlacionadas com significativa *up* ou *dowregulation*, indução de novo ou silenciamento de genes críticos para o desenvolvimento fetal e neonatal.

A produção *in vitro* de embriões está associada a mudanças na expressão gênica e também baixa taxa de sobrevivência embrionária pós-transferência, resultando em altas taxas de abortos. Por isso, mais importante do que conseguir grandes quantidades de embriões *in vitro*, é conseguir embriões com qualidade para gerarem gestações a termo, com bezerros saudáveis (87).

Uma das técnica já consolidada no mercado para estudos de expressão do genoma é a reação em cadeia da polimerase (PCR), técnica que possibilita a amplificação de segmentos do genoma a partir de diferentes tipos de material biológico, como fragmentos de tecido, sêmen, secreções, tem sido a técnica mais utilizada (88).

### 2.3 MARCADORES MOLECULARES DE EMBRIÕES

A ativação do genoma embrionário de bovinos só ocorre no estágio de oito células o que caracteriza a transição materna – zigótica. Então a sobrevivência do embrião nas fases iniciais depende da qualidade do oócito e, após a ativação do genoma embrionário, dependerá de sua capacidade de se adaptar às condições *in vivo* ou *in vitro* utilizando suas reservas endógenas ou captando substratos externos (62). Nos oócitos as vias anabólicas, como a síntese de proteínas, de DNA e de RNA e síntese reservas energéticas na forma de triglicerídeos e glicogênio, estão



ativas para suprimento não apenas das necessidades dessa célula como também do embrião no período pré-implantação, pois até as fases iniciais de clivagem a transcrição de genes do embrião é limitada e há dependência do ambiente *in vivo* ou *in vitro* e das reservas energéticas que são acumuladas durante o período de maturação oocitária (77).

Encontrar um equilíbrio de nutrientes desde o cultivo *in vitro*, o ambiente intra-uterino até a fase adulta é fundamental, pois isso influencia nas características fenotípicas que serão percebidas nas células e nos indivíduos na fase adulta. Ao mesmo tempo, observa-se como a linha que separa a boa nutrição da carência de nutrientes em determinadas situações fisiológicas é tênue. Por isso, uma análise detalhada do perfil metabólico e traçar correlações entre consumo/produção de determinados nutrientes e a viabilidade celular é fundamental para atingir o objetivo de melhorar os sistemas de cultivo *in vitro*, permitindo o excelente aporte de nutrientes que levarão o embrião a viabilidade e a competência.

Entretanto, pouco avanço do conhecimento do perfil metabólico de embriões de várias espécies tem sido alcançado. Ainda há necessidade de muitos estudos que determinem as características metabólicas individuais de cada embrião e sua correlação com viabilidade embrionária e geração de gestações (80; 65). Com relação a embriões bovinos, há uma grande gama de estudos propondo marcadores moleculares, utilizando metodologias invasivas, ou seja, que destruirão as estruturas celulares e impossibilitarão a transferência e o estudo *in vivo*. Logo, o advento de marcadores não invasivos que permitam a identificação do perfil metabólico de embriões individuais pode permitir o avanço das tecnologias reprodutivas.

Diversos grupos de pesquisa têm identificado e quantificado em embriões produzidos *in vitro*, genes associados a diversos processos celulares como o estresse oxidativo (MnSOD, CuZnSOD, e SOX), apoptose (BAX, Bcl2) e estresse celular (HSP70), comunicação entre células (gap-junctions Cx31 e Cx43), diferenciação celular (LIF), reconhecimento materno (IFN-tau), metabolismo (GLUT1, GLUT4, PDH, G6PDH, GAPDH), competência e viabilidade (COX-2, CDX) entre outros (50;89;90).

As alterações são, provavelmente, causadas por modificações epigenéticas, como a metilação do DNA e modificações nas histonas (91). Alguns estudos

demonstram que genes induzidos pelo estresse como o SOX, MnSOD, BAX, HSP-70 e G6PDH são altamente transcritos em embriões produzidos *in vitro*. Por outro lado, genes relacionados com o metabolismo, crescimento e diferenciação (GLUT-5, CX43, IGF-II e IGF-IR) foram detectados em maior quantidade em embriões produzidos *in vivo* (91; 92). Estes padrões de transcrição refletem a resposta embrionária as condições de cultivo *in vitro* adversas e a plasticidade do desenvolvimento pré implantacional em condições sub-otimas, compensadas com o ajuste, pelo embrião, do seu programa de desenvolvimento (90).

Uma das causas da baixa eficiência das biotécnicas da reprodução é a expressão desbalanceada de genes importantes para o desenvolvimento. Já foram identificados vários genes com expressão alterada em embriões bovinos produzidos *in vitro*, tais como genes ligados ao cromossomo X (G6PD e PGK; WRENZYCKI et al., 2002), à apoptose e ao estresse térmico e oxidativo (HSP70, BAX, BCL-2 SOD) (91;92;93;94;95), ao transporte de glicose (GLUT-3 e GLUT- 4; KNIJN et al, 2005), à comunicação celular (CX43 e CX31; RIZOS et al., 2002), à diferenciação (LIF, LR- $\beta$ ), (96;97;98) a genes “imprinted” (99; 98) e a DNA metiltransferases (100;101).

### **2.3.1 Morte celular e apoptose em embriões**

Em termos clássicos, necrose e apoptose são dois tipos de morte celular, com aspectos distintos e induzidos por diferentes mecanismos. A apoptose é considerada operacional, morfológica e bioquimicamente distinta da morte celular por necrose (92;102). A necrose é induzida por eventos letais de origem química, biológica ou física. Inversamente, a apoptose depende da regulação gênica de processos biológicos dependentes de energia (reservas de ATP). Sabe-se atualmente que os dois fenômenos podem contribuir para a morte celular de oócitos e embriões, no entanto a morte celular por apoptose aparece com maior frequência principalmente nas células embrionárias.

Nas espécies de mamíferos, as perdas embrionárias podem ocorrer em todas as fases da gestação (103). A incidência de perda embrionária em novilhas inseminadas artificialmente pode chegar a 22% no décimo quarto dia de gestação, sem perdas adicionais até o trigéssimo dia. No intervalo correspondente aos 30 dias

até o período final da gestação, as perdas embrionárias/fetais alcançam índices próximos de 5% indicando que a maioria das perdas ocorre durante as duas primeiras semanas do desenvolvimento embrionário (103).

Embora se saiba muito pouco sobre os possíveis sinais de morte celular sejam executado e controlado, todas as vias apoptóticas terminam com a ativação das caspases (104; 105). A presença de blastômeros apoptóticos em embriões de mamíferos em fase de pré-implantação tem sido descrita em várias espécies, incluindo camundongo, ovelha, cavalo, vaca, porco e humanos (105).

Em mórulas e blastocistos humanos apresentando desenvolvimento normal, algumas células são submetidas espontaneamente ao processo de apoptose, o que indica a existência de um mecanismo fisiológico para a adequação do número de células embrionárias e sua funcionalidade e para a eliminação de células anormais (102). Em camundongos, a apoptose está envolvida na eliminação de embriões anormais durante o primeiro ciclo de clivagem e no segundo ciclo em humanos. O processo apoptótico tem sido observado em embriões após o estágio de 8 células (106). A maioria dos núcleos apoptóticos em blastocistos bovinos concentra-se na massa interna (MCI), enquanto se distribuem aleatoriamente no embrião humano. Durante o período pré-implantacional o embrião depende quase que exclusivamente do RNAm materno e das reservas oocitárias de proteínas acumuladas antes da ovulação. Portanto, é possível que o embrião perca a viabilidade e não seja capaz de sobreviver por não possuir os produtos de origem materna necessários, ou por não expressar seus genes no momento certo (92).

Uma das alterações mais frequentes encontradas durante o desenvolvimento pós-clivagem do embrião está relacionada com a fragmentação nuclear atribuída ao processo de morte celular programada, com maior acometimento das células. Acredita-se que o objetivo deste mecanismo seja eliminar algumas destas células que impeçam o potencial de desenvolvimento do trofotoderma e que possam ser letais ao embrião. A apoptose pode ser vista como um mecanismo de adaptação para permitir a sobrevivência embrionária e o desenvolvimento em condições de estresse (107). A condensação da cromatina e a fragmentação nuclear são observadas em 70%-80% do total de blastocistos produzidos *in vitro* em camundongos, em humano e em praticamente todos os blastocistos bovinos (106) e a presença destas mudanças celulares tem sido consideradas evidências de atividade apoptótica. Tem sido observado que embriões produzidos *in vitro* têm

maior índice de fragmentação de blastômeros que embriões produzidos *in vivo* (108). Há poucos dados na literatura sobre a influência da suplementação dos meios de cultura no índice de apoptose em embriões produzidos *in vitro*. SIRISATHIEN e BRACKETT (108) obtiveram índices de fragmentação nuclear em blastocistos bovinos resultantes de oócitos maturados em meio definidos com PVA comparáveis a blastocistos produzidos *in vitro* em sistemas convencionais de cultivo (106). Outros autores afirmam que o microambiente durante a MIV não afeta significativamente a fragmentação nuclear nos blastocistos produzidos *in vitro* (109). No entanto, CUI *et al.*, (110) sugerem que o soro afeta significativamente a expressão de genes reguladores de apoptose, resultando em alterações na apoptose e viabilidade de embriões suínos.

Em embriões murinos e humanos cerca de 15% a 50% das células morrem durante o período pré implantacional por mecanismos ainda pouco compreendidos (105). Um maior índice de sobrevivência dos embriões no período de pré-implantação pode ser alcançado por meio de avaliação de parâmetros como a taxa de desenvolvimento e grau de fragmentação nuclear e do aprimoramento das técnicas de seleção de embriões para a transferência. Um rápido crescimento e um baixo grau de fragmentação nuclear proporcionam maiores chances de sobrevivência embrionária (108).

Verifica-se que quando comparados a embriões produzidos *in vivo*, os embriões de PIV apresentam padrão alterado de expressão de genes, o que demonstra que o desafio futuro é estabelecer condições de cultivo que levem em conta as necessidades embrionárias e que permitam que os genes sejam expressos de maneira similar quando *in vivo* (111). Dessa forma, a quantificação da abundância relativa de transcritos, comumente avaliada por PCR em tempo real, pode ser utilizada para comparações entre embriões de diferentes origens (*in vivo* X *in vitro*) ou para avaliação de meios de cultivo de oócitos e embriões.

Exemplificando, os embriões produzidos *in vitro* apresentam maior abundância relativa de transcritos envolvidos em processos de apoptose e estresse celular. As proteínas BAX e BCL-2 são antagonistas, o gene BAX é classificado como marcador pró-apoptótico e BCL-2 como anti-apoptótico. Yang & Rajamahendran, (112) observaram que a expressão da proteína BAX foi muito maior que a expressão de BCL2 em embriões degenerados e concluíram que a apoptose é

responsável pela degeneração do oócito, fragmentação do embrião e perda embrionária. Dessa maneira a proteína BAX está relacionada às características apoptóticas como encolhimento do ooplasma e fragmentação celular, sendo indicativo de viabilidade tanto oocitária quanto embrionária. Especial, é um gene ligado à condição pró-apoptótica e sua função esta associada á atividade do BCL-2. A proporção entre as proteínas BAX:BCL-2 predetermina a resposta celular a um estímulo apoptótico. *Upregulation* do gene BAX em embriões produzidos *in vitro* tem sido descrita em diferentes estudos (27;111). Contudo, alterações na quantidade relativa de transcritos deste gene tem sido investigada, predominantemente, em embriões de PIV, em decorrência das condições do cultivo *in vitro* (27) e não da maturação *in vitro*.

Dados sobre a influência da MIV na expressão do gene BAX em embriões bovinos são escassos. Warzych e colaboradores (5) publicaram pela primeira vez dados sobre a expressão deste gene em embriões resultantes de oócitos maturados em diferentes condições de cultura. Todavia, não observaram alterações na abundancia relativa de transcritos do BAX em oócitos e blastocistos bovinos eclodidos, após a maturação *in vitro* em meio suplementados com PVP-40, BSA ou SFB (soro fetal bovino).

Yang & Rajamahendran (2002) observaram que a expressão de BCL-2 foi maior em embriões e oócitos de boa qualidade, baixa em embriões fragmentados e dificilmente detectada em oócitos desnudos. Contrariamente, a expressão de Bax foi observada em todos os tipos de oócitos e embriões com maior expressão nos oócitos desnudos. Adicionalmente, Rizos e colaboradores (2003) afirmam que a expressão do gene BAX pode representar um usual marcador para qualidade de blastocistos. Isso implica que a relação de BCL-2 e BAX pode ser usada como indicador da tendência para apoptose ou sobrevivência dos embriões.

Em 2006, Martins e colaboradores (2006) trabalhando com vacas aneloras tratadas com alto ou baixo nível de ingestão alimentar, encontraram maior expressão global dos genes avaliados (BAX, GRB-10, GPX-4, Mn-SOD e Catalase), além de maior expressão do gene BAX nos embriões produzidos *in vitro*, provenientes das doadoras sob regime de baixa ingestão alimentar e sugeriu-se que dieta restrita em energia influenciou positivamente os fatores relacionados à qualidade oocitária e conseqüentemente, o desenvolvimento embrionário em bovinos.

### 2.3.2 Genes estresse térmico celular

A fase de pré-implantação representa um período extremamente dinâmico da embriogênese, no qual o embrião se desenvolve a partir de uma única célula, sob o controle genético da transcrição materna, em um conjunto de células altamente ativas metabólica e sinteticamente, agora sobre seu próprio controle genético.

Durante esse período o embrião passa por várias divisões celulares e três eventos importantes ocorrem: a compactação da mórula, a formação do blastocisto, com surgimento da blastocele e a diferenciação em dois tipos celulares (trofoectoderme e massa celular interna), e a eclosão do blastocisto. Essas funções requerem a regulação precisa de várias funções celulares como a homeostasia, metabolismo e expressão gênica (113).

A capacidade de um embrião responder a mudanças no seu ambiente é limitada durante as primeiras divisões de clivagem, quando grande parte do genoma embrionário é ainda inativo. Esse período de baixa atividade transcricional cria uma janela na qual os embriões são particularmente sensíveis a certas formas de estresse. Uma das alterações no ambiente materno que causam efeitos profundos na sobrevivência embrionária é um aumento na temperatura corpórea em decorrência do calor ou da febre (107). As alterações adaptativas que permitem aquisição de termotolerância são provavelmente resultado de mudanças na expressão gênica e/ou na atividade de sistemas bioquímicos que comandam as funções celulares frente a alguma agressão como, por exemplo, as altas temperaturas (116).

Estratégias para aumentar a fertilidade durante o ETC (Estresse Térmico Celular) são pesquisadas para identificar as causas fisiológicas que levam a falhas na fertilização e a mortalidade embrionária e assim poder desenvolver métodos que corrijam este problema. Para isto, deve-se entender e explorar os fatores que aumentam a resistência do oócito e do embrião às elevadas temperaturas, como moléculas citoprotetoras no trato reprodutivo e genes controladores da termotolerância (117), bem como os fatores que auxiliam na implantação e desenvolvimento embrionário inicial.

A capacidade de transcrição celular em resposta a elevadas temperaturas parece ser importante para proteção ao ETC e expressão de diferenças genéticas

(86; 118). A aquisição de termotolerância pode incluir mudanças na capacidade de produção de moléculas envolvidas em termoproteção, tais como HSPs ou antioxidantes (119). Células submetidas a vários fatores estressantes aumentam a produção de HSPs, que estão presentes em organismos, abrangendo da bactéria ao homem. A identificação de genes HSP específicos que contribuam para a sobrevivência dos embriões pode ser uma oportunidade única para melhorar a proteção dos embriões de PIV de diferentes condições tóxicas, favorecendo a concepção e a manutenção da gestação (120).

A resposta ao ETC e a aquisição da capacidade de termotolerância pelas células submetidas a algum tipo de estresse envolve a síntese de moléculas citoprotetoras, como as proteínas de choque térmico (heat shock protein - HSP). Nos mamíferos, a resposta ao estresse inclui alteração de expressão gênica sob a regulação do fator de transcrição de choque térmico (121) com uma rápida indução de transcrição de HSP em uma grande variedade de células e tecidos (122).

As HSPs são chaperonas que promovem a proteção celular contra efeitos deletérios do calor, prevenindo a desnaturação proteica (123). Suas transcrições são aumentadas com o choque térmico e outros estímulos estressantes e constituem um indicador de estresse em embriões bovinos (124). As HSPs podem estabilizar os efeitos negativos do ambiente como uma resposta ao estresse e, assim, aumentar, a proliferação/reparo celular e a sobrevivência embrionária, inibindo a apoptose e, conseqüentemente, prevenindo a morte celular. A HSP70 e a HSP40 implicam a proteção contra apoptose induzida por uma variedade de estímulos (125).

A expressão de HSP70 ocorre constitutivamente em vários tipos celulares e tem sua expressão aumentada quando as células são expostas a um agente estressor como o calor, análogos de aminoácidos, metais pesados, infecção e estresse oxidativo (122). Esta proteína é capaz de estabilizar proteínas e organelas intracelulares, além de inibir a apoptose celular. As células embrionárias parecem expressar HSP70 constitutivamente, com pico de expressão durante a ativação do genoma embrionário, ou em resposta a um agente estressor, apontando para um papel essencial da HSP70 tanto no desenvolvimento normal, quanto na proteção das células embrionárias contra algum dano (122). Edwards & Hansen (1997) demonstraram que embriões bovinos, já no estágio de duas células, são capazes de sintetizar grandes quantidades de HSP70 em resposta ao estresse térmico de 42°C

e Chandioli et al. (1999) verificaram que o aumento de HSP70 nos embriões bovinos de duas células foi resultado de uma nova transcrição.

O fato de embriões nos estádios de duas a quatro células serem mais susceptíveis a elevações de temperatura do que embriões no estágio de mórula devem-se, principalmente, à incapacidade destes embriões em sintetizar HSP70 como resposta ao estresse celular (123). A síntese das HSPs ocorre prematuramente no estágio de oito células devido à completa ativação do genoma embrionário (128). No estágio de oito células em diante, o aumento da síntese de RNAm HSP70 em resposta ao ECT pode ser responsável pela resistência embrionária a elevadas cargas térmicas (119).

A diminuição da sobrevivência embrionária após a exposição a elevadas temperaturas envolve um aumento na produção de radicais livres, os quais são moléculas que possuem elétrons sem par, ou seja, que estão desbalanceadas e que se ligam a outras moléculas, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, causando dano celular (129). A geração de espécies reativas do oxigênio em resposta ao ETC diminui com o avanço do desenvolvimento dos embriões bovinos, enquanto a concentração intracelular de antioxidantes citoplasmáticos aumenta (125).

### **2.3.3 Prostaglandinas COX e CDX**

El-Sayed e colaboradores (57) identificaram um grupo de genes relacionados com a sobrevivência embrionária ao compararem embriões produzidos *in vitro* que, quando transferidos para receptoras, geraram uma gestação ou foram reabsorvidos. Seis genes apresentaram maior expressão nos embriões que geraram uma gestação, quando comparados aos embriões que sofreram reabsorção, sugerindo que estes genes podem ter um papel fundamental no desenvolvimento inicial e a implantação dos embriões. Dentre estes genes, pode-se citar, o CDX e COX.

As prostaglandinas (PG) têm sido implicadas em vários processos do desenvolvimento embrionário precoce, nomeadamente na expansão e eclosão dos blastocistos (131;132). A ciclo-oxigenase (COX) é a enzima responsável pela metabolização do ácido araquidónico e precursor de todas as PG. A COX foi identificada



nos embriões bovinos logo a partir do estadio de 2 células apresentando, no entanto, uma expressão transitória associada às primeiras clivagens e decrescendo no estadio de mórula (133). Um segundo pico de expressão da COX poderá existir nos embriões bovinos uma vez que foi detectada uma produção crescente de PG a partir da eclosão da zona pelúcida até a implantação (134; 131).

COX apresenta duas isoformas, a COX-1 e a COX-2, com constituições e funções diferentes. A COX-1 é expressa constitutivamente e a sua expressão parece ser relativamente independente dos estímulos. Já a COX-2, identificada mais recentemente, pode ser induzida por vários factores como as citoquinas, factores de crescimento ou outros (135). A importância relativa da expressão e função das duas isoformas da COX no desenvolvimento embrionário precoce é pouco conhecida. Charpigny et al. (1997) demonstraram que a COX-2 é altamente expressa em embriões ovinos do dia 8 ao 17 de desenvolvimento, enquanto a COX-1 é indetectável durante o mesmo período, sugerindo uma função para a COX -2 na eclosão e posterior implantação dos embriões.

A proteína de COX-2 foi encontrada em altos níveis de expressão em blastocistos bovinos que resultaram em gestação e nascimento a termo (57). Maior expressão da COX-2 na janela de implantação embrionária sugere um papel importante das PGs liberadas pelo embrião na mediação das interações com o útero materno (57). Durante a implantação de embriões ovinos, as células trofoblásticas se tornam adesivas e a sua capacidade de invasão está diretamente relacionada com os níveis de expressão de COX-2 que, portanto, deve ter um papel importante na implantação embrionária (136).

COX-2 é induzida por diversos estímulos, incluindo citocinas, fator de crescimento, promotores tumorais, regula a inflamação, a diferenciação e a angiogenese (137). A enzima COX-2 desempenha um papel importante em eventos reprodutivos, como a ovulação (138), luteólise (139), alongação embrionária (140) e implantação, como também no término da gestação (120). Ela desempenha um importante papel na manutenção da gestação em vacas (141); e também mostra um papel crucial no transporte e passagem de embriões equinos do oviduto para o útero (142), na eclosão de blastocistos ovinos e de camundongos (143), na implantação de embriões de camundongos (144) e na expansão e competência de blastocistos bovinos (141).

O CDX um fator de transcrição, é um gene expresso especificamente pelo trofotoderma de embriões no período de pré e pós-implantação, sendo necessário para sua formação e integridade e, portanto, importante para o desenvolvimento normal do embrião (145). Em ratos, já está bem estabelecido que o CDX é importante para a implantação e desenvolvimento da placenta (146). Embriões CDX nulo falham em implantar e morrem no estágio pré-implantacional, sugerindo defeito no desenvolvimento. Esta falha na implantação é devido a perda da integridade do epitélio e/ou aumento da apoptose (146).

Portanto, CDX é um fator de transcrição específico da trofotoderma, sendo necessário para a repressão da expressão de alguns genes e consequente desenvolvimento normal do blastocisto. Poucos trabalhos analisaram a expressão de CDX em embriões bovinos. Num destes trabalhos, foi verificado que o gene CDX encontra-se aumentado em embriões bovinos produzidos *in vitro* que, quando transferidos, originaram gestação, quando comparados com aqueles embriões que sofreram reabsorção uterina ao serem transferidos (57).

Embriões bovinos produzidos por transferência nuclear apresentam expressão de CDX alterada e em quantidade inferior quando comparado com embriões produzidos *in vivo*. Talvez isto explique o fato dos embriões produzidos por transferência nuclear apresentarem maior taxa de perda embrionária quando comparado com os produzidos *in vivo* (147). Embriões com ausência do CDX falharam em implantar, sugerindo defeito no desenvolvimento do trofotoderma, que perdeu sua integridade epitelial e/ou aumentou a apoptose (146).

Os genes citados (COX e CDX) apresentam maior expressão em embriões de melhor qualidade e são poucos expressos em embriões considerados inaptos a implantação.

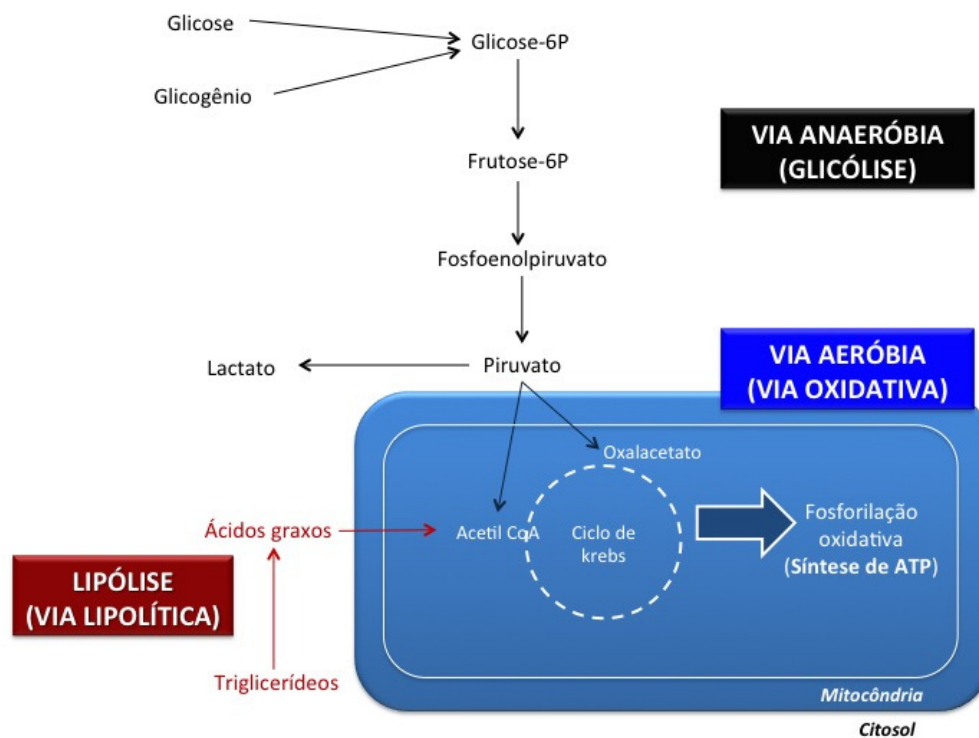
### 2.3.4 Metabolismo intermediário de *complexo cumulus- oócito* e embriões

A glicose é o substrato energético preferido pelas células do *cumulus* (148), enquanto que os oócitos, na grande maioria das espécies de mamíferos estudadas consomem pouca glicose e utiliza o piruvato como substrato energético preferido (32). Em geral, os oócitos têm menor capacidade de assimilação direta de glicose, bem como expressão limitada de enzimas glicolíticas, utilizando assim o piruvato de forma mais eficiente, (149). Contudo, em suínos e macacos Rhesus, a glicose parece ser a principal fonte energética oocitária (120). Sendo assim, nas demais espécies, o piruvato é o substrato oxidável derivado das células do *cumulus* para a síntese de ATP necessária aos oócitos (120; 150). Nas células do *cumulus* a glicose é captada através da ação dos facilitadores do transporte da glicose (GLUT) (153; 154). Após ser captada, a glicose influencia vários aspectos da maturação oocitária e o seu metabolismo está relacionado com a capacidade de desenvolvimento do oócito (155). A glicose tem como função fornecer energia para promover a homeostase celular, a maturação nuclear, além de ser substrato para a produção da matriz extracelular.

Quatro vias metabólicas da glicose foram identificadas: a via de biossíntese da hexosamina, a glicólise (produção de energia), a via pentose fosfato, e a via poliol (148). A via da biossíntese da hexosamina é fundamental para a expansão do *cumulus*, pois permite que a glicose seja utilizada para a síntese de glicosaminoglicanos, como o ácido hialurônico. A principal enzima reguladora da via da hexosamina é a L-glicosamina: D-frutose-6-fosfato acetil transferase (GFPT) que converte a frutose-6-fosfato em glicosamina-6-fosfato, permitindo a produção de UDP-N-acetil glicosamina, o produto final da via. Nas células do *cumulus*, a maioria da UDP-N-acetil glicosamina é convertida pela enzima HAS2 em ácido hialurônico, o principal componente da matriz extracelular das células do *cumulus* (148; 155). Para a síntese do piruvato, substrato mitocondrial para a obtenção de ATP que levará à síntese de proteínas que darão suporte à conclusão dos processos de maturação e desenvolvimento embrionário subsequente (156), a via utilizada é a glicólise. A enzima responsável por regular esta via é a fosfofrutoquinase (PFKP), que converte a frutose-6-fosfato em frutose 1,6-bifosfato, permitindo a produção de piruvato ou

lactato, os produtos finais dessa via (157) conversão de piruvato e lactato e vice versa se dá pela enzima lactato desidrogenase (LDHA) (158). O lactato tem como função permitir o estado antioxidante citosólico, conhecido também como estado redox, cuja função é promover a integridade citoplasmática (113). Já o piruvato serve de substrato para a enzima oxidativa mitocondrial denominada piruvato desidrogenase 1 (PDHA1), presente nas células do *cumulus* e oócito de camundongos e tem como função catalisar a formação da adenosina trifosfato (ATP) com consumo de oxigênio e liberação de dióxido de carbono. O ATP é reconhecido como a moeda energética essencial para a maturação oocitária (113). A via pentose fosfato (PPP) é menos utilizada do que as outras vias e tem como função captar glicose para a síntese de purinas ou nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase (NADPH), o que depende do processo ser oxidativo ou não. O NADPH é produzido através da oxidação da glicose-6- fosfato em 6-fosfogluclactona pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6DPH) e é utilizado para promover a integridade citoplasmática, contribuindo para a manutenção do estado redox pela redução da glutathione em glutathione reduzida (148), promovendo assim um sistema antioxidante celular benéfico (113). Outro produto da via PPP é o fosforibosilpirofosfato, substrato para síntese de purinas, as quais são fundamentais na síntese de nucleotídeos formadores de novos RNAm , controlando assim a maturação nuclear (148). Finalmente, a via do poliálcool leva à oxidação de glicose com geração de sorbitol e frutose através das enzimas aldo-redutase e sorbitol desidrogenase.

Esses substratos são considerados fontes alternativas de energia para o oócito, embora ainda não se saiba em que circunstâncias e para quais funções elas seriam importantes. A suplementação com esses substratos energéticos é ineficiente em promover a maturação oocitária na ausência de glicose, demonstrando que a glicose é necessária como fonte energética para que as células do *cumulus* sustentem a maturação oocitária.



**Figura 1: Vias do metabolismo intermediário relevantes ao desenvolvimento das células embrionárias.**

Glicólise (via glicolítica ou anaeróbia): via metabólica que não utiliza oxigênio em suas reações e gera lactato como produto final. Pode utilizar a glicose captada através de transportadores celulares ou da hidrólise do glicogênio intracelular.

Via aeróbia (ou oxidativa): o piruvato pode ser convertido a oxalacetato ou acetil CoA e os ácidos graxos podem ser convertidos a acetil CoA. Gera ATPs por meio do ciclo de Krebs (ciclo do ácido cítrico) e da fosforilação oxidativa utilizando o aparato enzimático presente nas mitocôndrias.

Lipólise (via lipolítica): via de degradação da principal reserva energética de embriões bovinos, os triglicerídeos.

## 2.4 RESULTADOS PROMISSORES DO LABORATÓRIO

A variabilidade de competência de oócitos até pode ser considerada um processo de seleção natural produzindo apenas seres capazes de sobreviver à pressão biológica, porém isso não é o suficiente e não pode ser um limitante para as técnicas reprodutivas. É de suma importância conhecer as variáveis que levam a esse processo de seleção para melhorar a capacidade dos sistemas de geração de embriões *in vitro* de bovinos.

Nosso laboratório desenvolveu um meio de cultura semi-definido suplementado com BSA no qual se observou taxa de fertilização com menor índice

de anomalias (poliploidias) e um desenvolvimento embrionário pré-implantação semelhante em porcentagem ao meio padrão utilizado na literatura (dados não publicados).

Posteriormente, ao substituir o BSA por álcool polivinílico (PVA) obteve-se um meio totalmente definido, o MEMC [meio patenteado sob o número de IP08031140-1, também denominado de MIVC], que é capaz de retardar a maturação nuclear do oócito, permitindo que a maturação citoplasmática avance *in vitro* (10). A produção de embriões no MEMC é menor quando comparado ao meio comercial e apenas a adição de FSH é capaz de elevar a produção de taxas semelhante de embriões (blastocistos) *in vitro* ao meio comercial (11).

O meio MEMC também foi testado em modelo de cultura de hemisseções da parede de folículo antral (4–5 mm). Nesse modelo de co-cultivo, o meio MEMC causou o aumento da expressão das enzimas da esteroidogênese e do receptor de FSH, além de manter a produção de progesterona e 17 beta-estradiol, a morfologia das células e a presença de conexina-43 (19). Esses dados demonstram que os folículos foram resgatados de uma possível atresia e mantidos como folículos saudáveis em cultura.

Diversos efeitos benéficos foram demonstrados com o MEMC, porém trabalhos descritos na literatura indicam que embriões metabolicamente menos ativos seriam mais viáveis (80), o que levou ao teste de meios de cultivo de CCOs contendo menos aditivos hormonais. A ausência de fatores de crescimento e hormônios no meio, que nesse ponto da pesquisa originou o meio MEMB [meio patenteado e reserva de domínio da patente IP08031140-1, também denominado de MIVB], é capaz de inibir a progressão da meiose (158; 10). A ausência de hormônios no meio de cultivo de CCOs foi suficiente para produzir a mesma quantidade de embriões que o controle contendo soro, independentemente da presença ou ausência de FSH (11).

Diante dos resultados inéditos, pensou-se em desenvolver e testar a PIV também em um novo meio denominado Meio Origem, ou MEMO (MIVO), partindo-se do princípio que, reduzindo o número de constituintes no meio de cultura, obter-se-á um embrião menos ativo energeticamente, ou seja, um embrião silencioso (66).

Todas as evidências encontradas suscitaram novos questionamentos de como se dá o processo de desenvolvimento biológico do oócito até a formação do blastocisto *in vitro*. Portanto, a maturação do CCO *in vitro* é um dos objetos mais

importantes e mais estudados pela nossa linha de pesquisa e o presente trabalho pretende elucidar como o meio pode modular a expressão gênica de proteínas importantes para o desenvolvimento occitário.

### 3 OBJETIVOS

Analisar o efeito dos meios quimicamente definidos (MEMB e MEMO) na maturação oocitária *in vitro*, associados ou não ao FSH, 1 e 10ng/ml, sobre a produção de blastocistos bovinos e expressão gênica de proteínas relacionadas a competência e metabolismo do embrião.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir embriões *in vitro*, a partir de oócitos maturados em novos sistemas de cultura, utilizando os meios definidos formulados pelo nosso laboratório;
- Avaliar a ativação do FSH em concentrações 1 e 10ng/ml, nos diferentes meios;
- Avaliar a expressão de genes marcadores de metabolismo intermediário (GLUT-1, GLUT-4, PDH, G6PDH, GAPDH) nos diferentes meios;
- Avaliar a expressão de genes marcadores de apoptose celular (BAX e BCL-2) nos diferentes meios;
- Avaliar a expressão dos genes marcadores de competência embrionária (COX-2, CDX, HSP-70) nos diferentes meios;
- Avaliar a expansão das células do cumulus oophorus nos diferentes meios.



## 4 MATERIAIS E METODOS

### Coleta dos ovários e seleção dos oócitos

Ovários bovinos foram obtidos em frigorífico na cidade de Montes Claros- MG; mantidos à temperatura inicial entre 35 - 37°C em solução fisiológica de NaCl. O transporte até o laboratório realizou-se durante um tempo não superior a 2 horas após o término do abate dos animais conforme definido na literatura (159).

No laboratório, os folículos entre 2 e 8 mm de diâmetro foram aspirados com auxílio de uma seringa 10mL e agulha 21G (25mm X 0,8mm), e colocados em um tubo cônico de 50 ml mantidos em banho Maria a 37°C. Após 30 minutos de sedimentação do líquido folicular, os CCOs foram ressuspensos em placas de petri contendo uma mistura de fluido folicular e solução PBS/BSA, composta de tampão fosfato (PBS-GIBCO); albumina sérica bovina (BSA) fração V (Sigma); piruvato de sódio (Sigma); e penicilina (Sigma) e estreptomicina (Sigma) para a seleção dos CCOs. Antes de ser utilizada a solução PBS/BSA era esterilizada em filtros estéreis e descartáveis contendo membrana específica para filtração (Millex®, 33 mm, Millipore).

A seleção morfológica dos CCOs foi feita em estereomicroscópio de acordo com os critérios (160) e apenas os classificados em grau I e II foram selecionados para o cultivo. A classificação morfológica segue os critérios de Viana e colaboradores.

Entre 25 a 30 CCOs foram cultivados conjuntamente por 22 a 24 horas em 400 µL de um dos meios de maturação *in vitro*, pré-incubados por no mínimo 2 horas em estufa, com ambiente controlado em 95% de umidade (umidade saturada), 5% de CO<sub>2</sub> e a 38,5°C, para equilibrar o pH dos meios de cultivo.

Experimentos com os grupos de meios foram realizados em 10 (dez) replicatas, sendo agrupados e relatados como número de oócitos maturados e porcentagem de desenvolvimento embrionário indicado (blastocistos).

### Meios de cultura de maturação *in vitro*

O meio de cultura TCM-199 (usado como meio controle) é um meio suplementado com Soro Fetal Bovino e usado em laboratórios de produção de embriões *in vitro* comercialmente.

O meio definido MEMB é composto de um meio diluente Alpha-MEM (GIBCO) suplementado com hepes (Sigma), bicarbonato (Sigma), álcool polivinílico (PVA) (Sigma), transferrina (GIBCO), aminoácidos não essenciais (Sigma), selênio e 50 UI/mL de penicilina (Sigma) e estreptomicina (Sigma). Antes de ser utilizado, o meio foi esterilizado por filtração em filtros estéreis e descartáveis contendo membrana específica (Millex®, 33 mm, Millipore).

O meio MEMB não foi suplementado com FSH. O meio MEMB+1FSH foi suplementado com 1 ng/mL de FSH (Sigma); o meio MEMB+10FSH foi suplementado com 10 ng/mL de FSH (Sigma). Após a preparação, os meios permanecem em estufa de CO<sub>2</sub> por 2 horas para estabilização do pH.

O meio definido MEMO é composto de um meio diluente Alpha-MEM (GIBCO) suplementado com hepes (Sigma), bicarbonato (Sigma), álcool polivinílico (PVA) (Sigma), e antibióticos 50 UI/mL de penicilina (Sigma) e estreptomicina (Sigma). Antes de ser utilizado, o meio foi esterilizado por filtração em filtros estéreis e descartáveis contendo membrana específica (Millex®, 33 mm, Millipore).

O meio MEMO não foi suplementado com FSH. O meio MEMO+1FSH foi suplementado com 1ng/mL de FSH (Sigma); o meio MEMO+10FSH foi suplementado com 10ng/mL de FSH (Sigma). Após a preparação, os meios permaneciam em estufa de CO<sub>2</sub> por 2 horas para estabilização do pH.

### Grupos experimentais utilizados no cultivo de CCOs:

- 1) TCM -199 (controle);
- 2) MIV B (*MEM B*);
- 3) MIV B + 1FSH (*MEM B +1ngFSH*);
- 4) MIV B + 10FSH (*MEM B+10ngFSH*);
- 5) MIV O (*MEM O*);
- 6) MIV O + 1 FSH(*MEM O +1ngFSH*);
- 7) MIV O + 10FSH (*MEM O 10ngFSH*).

### Avaliação da expansão das células do *cumulus* após o cultivo de maturação *in vitro*

O aspecto de expansão das células do *cumulus* também foi observado e descrito previamente por Sirard (162). A expansão do *cumulus* foi avaliada morfológicamente, pelo aspecto morfológico.

### Fecundação *in vitro*

Após a maturação, os oócitos foram transferidos para placa contendo gotas de 90 µL de meio Fert-Talp, acrescido de BSA, piruvato de sódio e de heparina. O sêmen congelado foi selecionado em gradiente Percoll 90% e 45%. A palheta de sêmen de um touro *Bos taurus* testado para a PIV foi descongelada por 20 segundos em banho-maria a 36,5°C. O gradiente de Percoll juntamente com o sêmen foram submetidos à centrifugação de 5.000 RPM por 5 minutos. Após a primeira centrifugação, foram retirados os sobrenadantes, deixando um pellet de aproximadamente 100µl e acrescentou-se 1,5 ml de meio FIV e submetidos a próxima centrifugação de 3.000 RPM por 2 minutos. Após foi retirado o sobrenadante deixando apenas o pellet de 100 µl, e a concentração final foi ajustada em contagem na camara de NewBauer para  $1 \times 10^6$  espermatozóides/ mL de meio Fert-Talp. Os oócitos/ espermatozóides foram incubados a 38,5°C por 18-22 horas em estufa de cultivo nas mesmas condições da maturação *in vitro*. PARRISH (160).

### Cultivo *in vitro*

As células do *Cumulus oophorus* foram removidas por movimentação de agitação mecânica por pipeta de 100 µl. Os supostos zigotos foram lavados em gotas de meio de lavagem TALP e posteriormente em meio SOF para cultivo. Os zigotos foram cultivados por 8 dias sob óleo mineral em estufa 5% de CO<sub>2</sub>, e 5% de O<sub>2</sub> à temperatura de 38,5°C. A avaliação da taxa de clivagem (D3) foi efetuada 72

horas após a fecundação (DO). A produção de blastocistos (inicial, blastocisto e blastocisto expandido) foi avaliada ao sétimo dia (D7) de cultivo.

Os embriões dos grupos MEMB+1FSH e MEMB+10FSH foram agrupados e analisados como apenas um grupo formando o MEMB+FSH. Os embriões dos grupos MEMO+1FSH e MEMO+10FSH foram agrupados e analisados como apenas um grupo formando o MEMO+FSH.

#### Isolamento dos embriões para PCR *RealTime*

Blastocistos obtidos a partir de oócitos maturados *in vitro* nos grupos controle e experimentais foram retirados do meio de cultivo e lavados para retirar resíduos de células do cultivo. O pool de embriões formados em cada grupo de meios (n= +-10/ tubo) foi congelado em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  na presença de 50 - 100  $\mu\text{L}$  Trizol Plus (Ambion, Life Technology) até o momento da extração do RNA total. Todas as análises de expressão gênica foram feitas pela técnica de PCR *real time*.

#### Isolamento do transcrito (RNA) total

Os embriões foram utilizados para extração do RNA total e síntese de cDNA para verificação da expressão gênica dos genes de interesse. O isolamento do RNA total seguiu o protocolo do Trizol Plus (Invitrogen). O RNA total foi ressuspenso em água destilada ultra pura, livre de RNase, DNase e pirogênio (Invitrogen), para posterior mensuração da concentração e qualidade do RNA.

A concentração e a qualidade do RNA foram verificadas utilizando 2  $\mu\text{L}$  do RNA ressuspenso de cada amostra por meio do aparelho NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific). O RNA utilizado para a síntese de cDNA deveria ter valor de absorbância  $A_{260}/A_{280}$  entre 1,8 e 2,0, indicando a qualidade da amostra. Se a amostra não alcançasse esse valor, seria descartada. Três amostras de RNA total de células do cumulus e ovócitos também foram utilizadas para a análise no

aparelho 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies®) onde foi identificada a qualidade da amostra pelo número de integridade do RNA (RIN). Os tubos contendo RNA foram estocados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da síntese de cDNA.

#### Síntese do DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit *QuantiTect® Reverse Transcription* (Qiagen) em tubos de 0,2 mL. Todos os passos indicados pelo fabricante foram seguidos. Após a finalização de todas as etapas o tubo contendo cDNA era colocado no gelo e, em seguida, estocado em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da avaliação de expressão gênica por PCR *real time*.

Padronização das condições de PCR *Real Time* (qPCR) para detecção dos genes de interesse.

Os genes contidos na Tabela 1 foram testados para avaliação da expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR *real time* ou qPCR). A partir das primeiras fitas de cDNA o gene de interesse é amplificado pela presença de um sistema enzimático específico e pela presença de *primers* específicos para a sequência do gene (154).

Os *primers* para cada gene de interesse foram desenhados baseados nos códigos do *GenBank* (Tabela de primers) utilizando o site da empresa Integrated DNA Technologies®. A ferramenta IDTSciTools® checa as características de cada sequência para determinar se satisfaziam as necessidades técnicas do PCR *real time*, como a geração de dímeros de *primer* ou a formação de estruturas secundárias que os impediriam proporcionar a amplificação da sequência de cDNA de interesse. Todos os *primers* obtiveram 100% de homologia com as referidas sequências genômicas de *Bos taurus*.

Após o desenho dos *primers*, foram feitos diversos testes para validar os *primers*, utilizando concentrações diferentes de *primers* e cDNA. Os *primers* foram

testados na presença do cDNA das amostras para verificação das temperaturas de *melting*, múltiplos picos na curva de *melting*, contaminações e outros possíveis erros. Após a padronização das condições ideais de trabalho, as análises dos experimentos foram realizadas para geração dos resultados finais.

Para o PCR *real time* trabalhou-se com mixes de componentes para diminuir o erro de pipetagem. Portanto, trabalhou-se com um cDNA mix e um *primer* mix. No cDNAmix eram colocados o cDNA (50 a 100 ng/ $\mu$ L de cDNA por poço de reação), água destilada ultra pura livre de RNase, DNase e pirogênio e o *SybrGreen Fast* (Applied Biosystem). Já o *primer* mix correspondia a mistura do *primers Forward* e *Reverse* diluídos em água, sendo que a concentração final de *primer* para o PCR *real time* era de 100 nM de *Forward* e 100 nM de *Reverse* por poço. O volume de reação de cada poço era igual a 20  $\mu$ L. As reações de PCR foram feitas utilizando triplicatas ou quadruplicatas idênticas.

Os ciclos de PCR foram 95°C por 20 segundos, para ativação da enzima; 95°C por 3 segundos, para desnaturação; e 60°C por 30 segundos para anelamento e extensão do cDNA (*Sybr Green Fast*; Applied Biosystem). O acúmulo dos produtos da amplificação do DNA de interesse foi mensurado pelo aumento da fluorescência de *SybrGreen Fast* (Applied Biosystem) a cada ciclo.

Para cálculo da quantificação relativa de expressão gênica foi utilizado o método  $\Delta\Delta$ CT. Para os experimentos de expressão gênica foram utilizadas duplicata a quadruplicata biológicas, ou seja, duas a quatro amostras (pool de células isoladas) de experimentos diferentes foram analisadas por qPCR.

Os valores de expressão foram padronizados pelo gene controle beta-actina (ACT) e o grupo TCM-199 como calibrador.

**Tabela 1: Tabela de primers - Desenhos dos *primers* e o código *GenBank* para cada transcrito da espécie *Bos taurus*.**

<i>Gene</i>	<i>Sequência dos primers</i>	<i>Código do GenBank ou referência</i>
<b><i>Controles internos (genes de referência)</i></b>		
<i>ACT</i>	F: GCTAGCACAGGCCTCTC R: ACGAGCGCAGCAATATCATC	NM_173979
<b><i>Metabolismo intermediário</i></b>		
<i>GLUT1</i>	F: CCAAGGATCTCTCAGAGCACAG R: TTCTTCTGGACATCACTGCTGG	Sagirkaya et al. 2007
<i>GLUT4</i>	F: CTCCCTGCAGTTTGGCTAC R: CCACGTCTGGTTGTAGAACTC	NM_174604
<i>PDH</i>	F: TGTTTCCTGAACCTGGAAGCTCCT R: AGCACTTCCACTTGTCTGGGATGT	NM_174507
<i>G6PDH</i>	F: AGGCCGTGTACACCAAGATGATGA R: ATCGGTTGCCATAGGTCAGGTCAA	NM_001244135
<i>GAPDH</i>	F: ATCATCTCTGCACCTTCTGCCGAT R: TGATGGCGTGGACAGTGGTCATAA	NM_001034034.2
<b><i>Apoptose celular</i></b>		
<i>BAX</i>	F: GTTGTGCGCCCTTTTCTACTTTG R: AAGGAAGTCCAATGTCCAGC	NM_173894
<i>BCL-2</i>	F: CCCTGT TTGATTTCTCCTGGCTGT R: TGGGCTTCACTTATGGCCCAGATA	NM_001166486
<b><i>Competência embrionária</i></b>		
<i>COX2</i>	F: CTCTGTCTTACTGGAACATGGTC R: GATACTTTCTCTACTGCGACTGG	NM_174445
<i>HSP70-1</i>	F: AACAAAGATCACCATACCAACG R: ACCTCGTCCTCCGCCTTGTAC	NM_174550
<i>CDX2</i>	F: CTTTCCTCCGGATGGTGATA R: AGCCAAGTGAAAACCAGGAC	Madeja et al. 2013

ACT: beta actina.

GLUT1: transportador facilitado de glicose 1; GLUT4: transportador facilitado de glicose 4; PDH: piruvato desidrogenase; G6PDH: glicose 6-fosfato desidrogenase; GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

BAX: proteína X associada à família Bcl-2; BCL-2: *B-cell CLL/lymphoma-2*.

COX2: prostaglandina-endoperoxidasesintase 2; HSP70-1: proteína de choque térmico 70-1; CDX2: fator de transcrição tipo-caudal 2.

### Análise estatística

Para a análise de produção de embriões referentes à maturação no meio controle e meios testes definidos, utilizou-se o teste Qui-quadrado e a análise de ANOVA (Análise de Variância) de uma via para verificar diferenças estatísticas e o teste ANOVA de duas vias para determinar diferenças entre os grupos de tratamento MEMB e MEMO. As diferenças entre as médias dos grupos experimentais foram consideradas significativas quando os valores de probabilidade foram iguais ou menores do que 0,05 ( $p < 0,05$ ) no programa BioStat 5.0.

Para a análise dos genes utilizou-se o teste Kruskal-Wallis para determinar diferenças entre os grupos e o teste Student-Newman-Keuls; para determinar diferenças entre os grupos de tratamento.



## 5 RESULTADOS

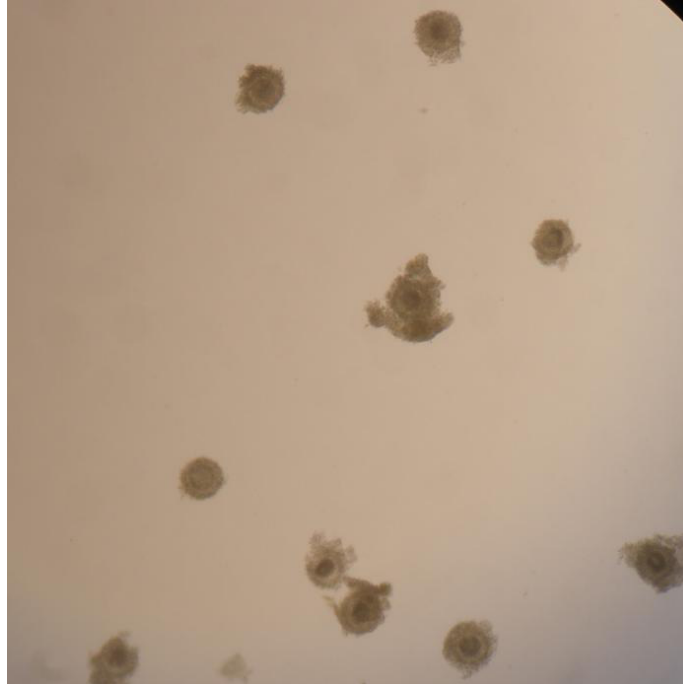
Experimento 1: O efeito do FSH adicionado ao meio de maturação MEMB, indutor da inibição da maturação nuclear oocitária, sobre a expansão das células do *cumulus*.

Observa-se na figura 2, que há nítida expansão das células do *cumulus* dos CCOs maturados em meio controle TCM, fato indicativo da maturidade do oócito. Já, nos CCOs maturados em meio MEMB, figura 3, as células do *cúmulus* não se encontravam expandidas, fato indicativo de imaturidade do complexo *cumulus oophorus*.

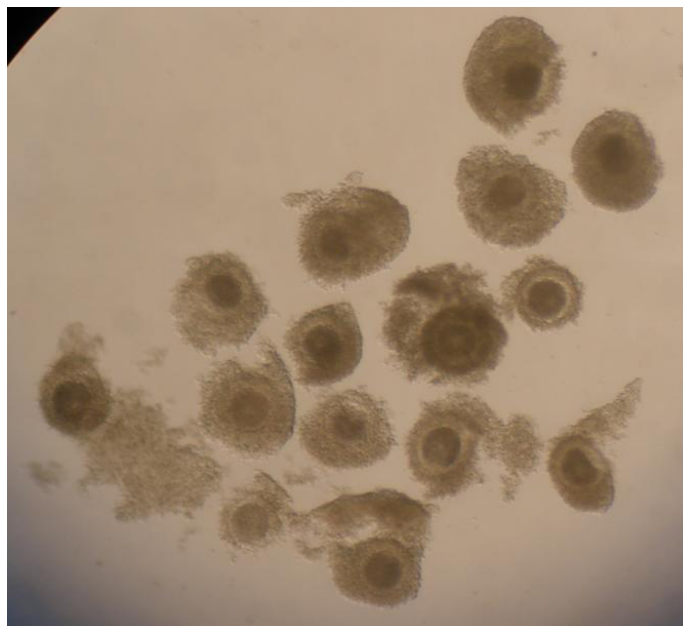
Tambem são aparentemente contraditórios os resultados observados entre a expansão das células do *cumulus* e a produção de embriões observada no MEMB, nos grupos que foram adicionados o FSH (figuras 4 e 5). Na presença de FSH as células do *cumulus* estão expandidas (grupo MEMB+FSH) e neste mesmo grupo há redução na produção de embriões.



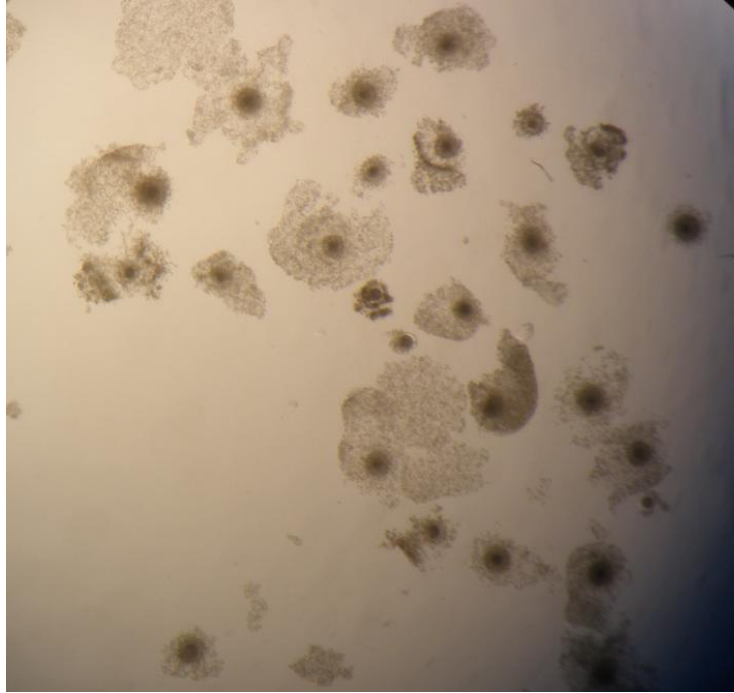
**Figura 2:** Aspecto morfológico de oócitos cultivados em meio controle de laboratório (TCM-199) contendo 10% de soro de vaca em estro e FSH (100ng), após 24 horas de cultivo. Nota-se a expansão das células do *cumulus* na maioria dos oócitos, fato indicativo de maturidade oocitária (aumento 10X).



**Figura 3:** Aspecto morfológico de oócitos cultivados em meio MEMB após 24 horas de cultivo. Nota-se a não expansão das células do cumulus em todos os oócitos, fato indicativo de imaturidade oocitária. Os oócitos encontram-se praticamente isolados, ao contrário do observado no meio controle (aumento 10X).



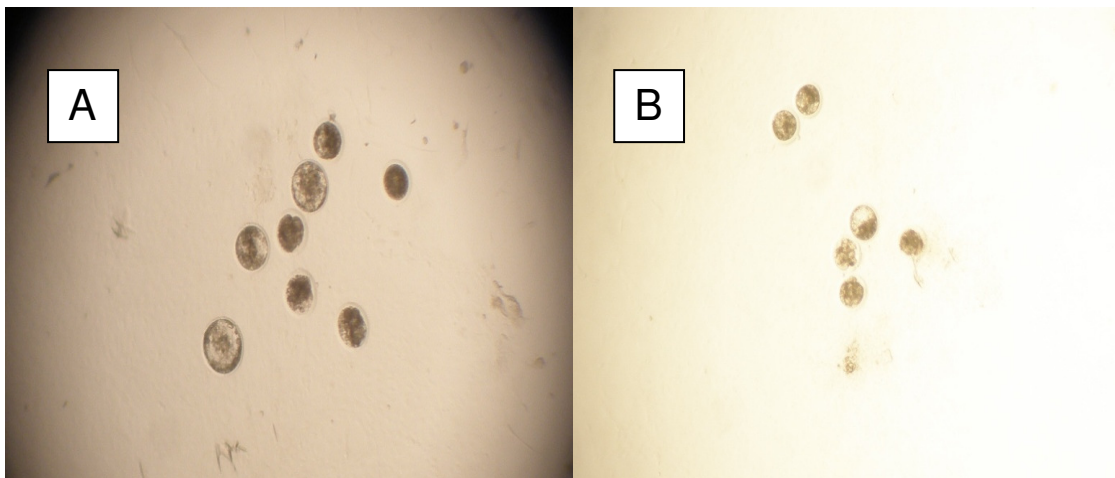
**Figura 4:** Aspecto morfológico de oócitos cultivados em meio MEMB suplementado com 1 ng de FSH após 24 horas de cultivo. Nota-se a expansão das células do cumulus em todos os oócitos, fato indicativo de maturidade oocitária. Ao contrário de meio MEMB, os oócitos estão mais agrupados, em função da adição de 1 ng de FSH (aumento 10X).



**Figura 5:** Aspecto morfológico de oócitos cultivados em meio MEMB suplementado com 10 ng de FSH após 24 horas de cultivo. Nota-se a expansão das células do cumulus em todos os oócitos, fato indicativo de maturidade oocitária. Ao contrário de meio MEMB e MEMB+1FSH, os oócitos estão mais expandidos em função da adição de 10ng de FSH (aumento 10X).

Experimento 2: O efeito do FSH adicionado ao meio de maturação MEMB, indutor da inibição da maturação nuclear oocitária, sobre a produção *in vitro* de embriões oriundos da fertilização destes oócitos bovinos.

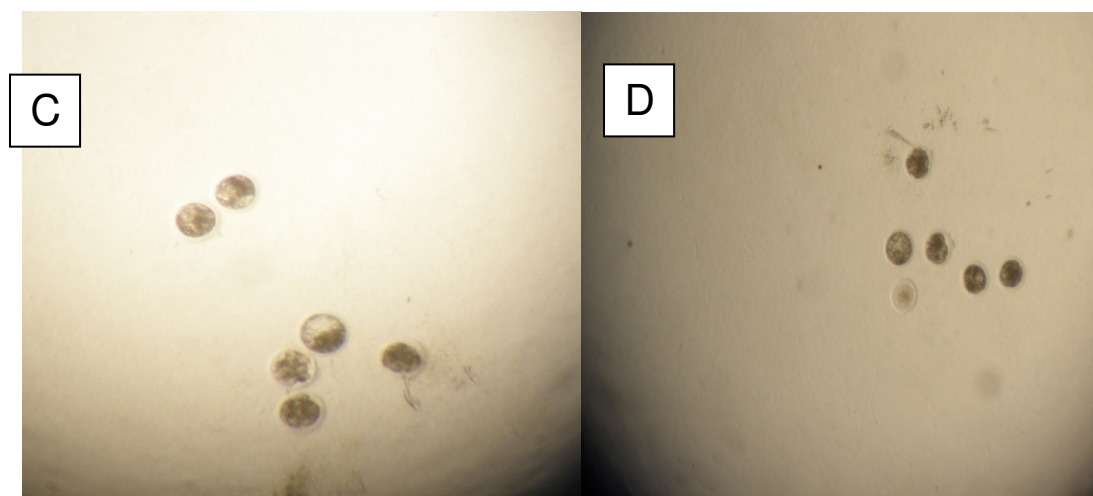
Avaliou-se o efeito do FSH 1ng e 10 ng adicionados ao meio de cultura de maturação MEMB e analisou-se a produção *in vitro* de embriões em cada meio. Como meio controle utilizou-se o TCM-199 e o comparou com o meio MEMB, MEMB+1FSH e MEMB+10FSH (Figura 6 e 7).



**Figura 6:** Embriões produzidos *in vitro*, sete dias (D7) após a FIV.

A) Maturação em meio controle TCM-199 (aumento 10X).

B) Maturação em meio teste MEMB (aumento 10X).



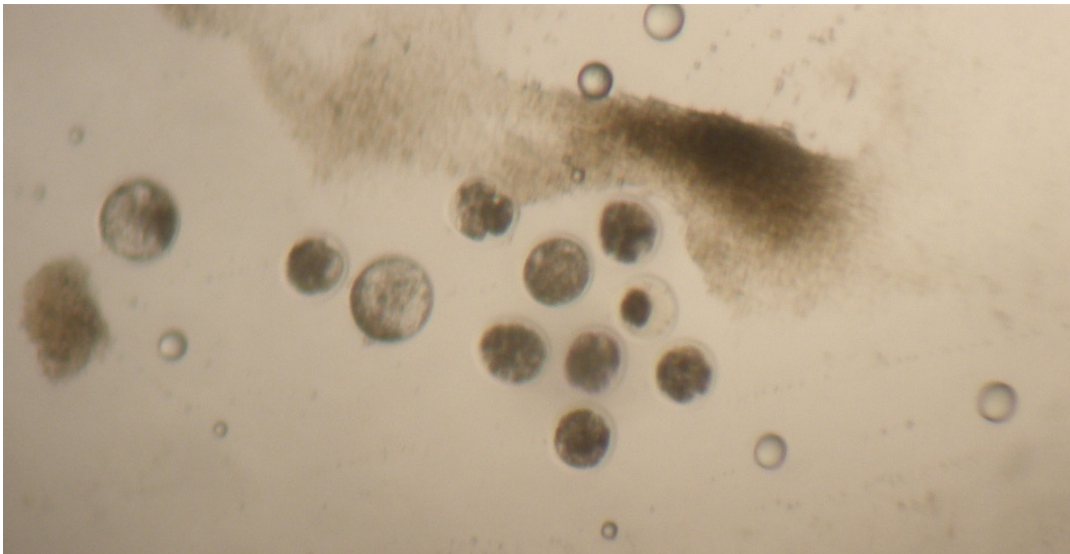
**Figura 7:** Embriões produzidos *in vitro*, sete dias (D7) após a FIV.

C) Maturação em meio teste MEMB+1FSH (aumento 10X).

D) Maturação em meio teste MEMB+10FSH (aumento 10X).

Experimento 3: O efeito do FSH adicionado ao meio de maturação MEMO, indutor da inibição da maturação nuclear oocitária, sobre a produção *in vitro* de embriões oriundos da fertilização destes oócitos bovinos.

Avaliou-se o efeito do FSH 10 ng adicionados ao meio de cultura de maturação MEMO e a produção de embriões em oócitos incubados durante 24 horas no meio de maturação (Figura 8).

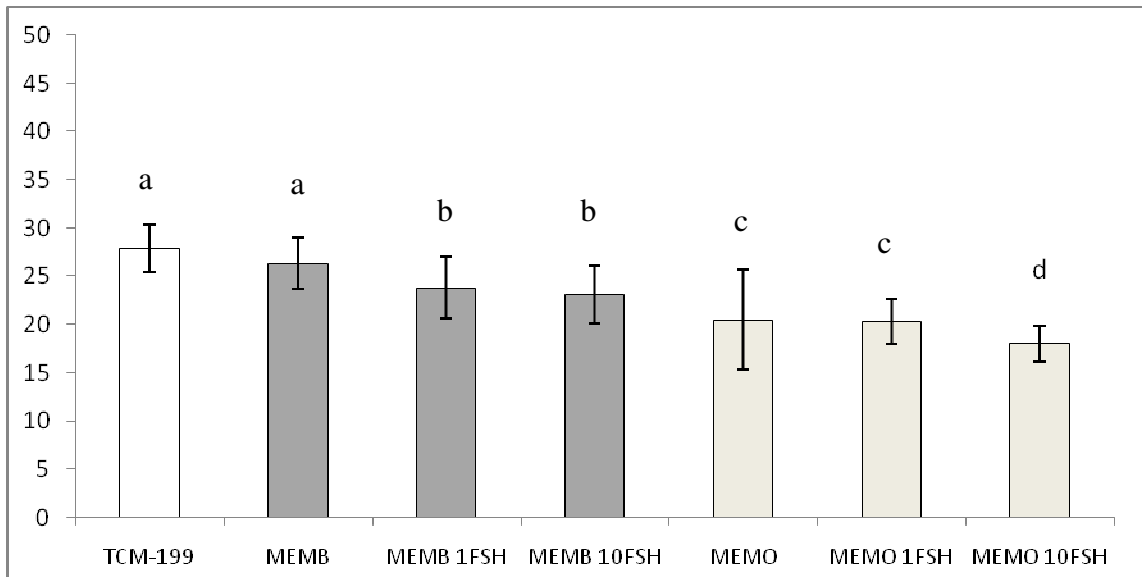


**Figura 8:** Embriões produzidos *in vitro*, sete dias (D7) após a FIV. Maturação em meio teste MEMO+10FSH (aumento 10X).

**Tabela 2: Percentagem de embriões oriundos de maturação em meio controle e meios quimicamente definidos.**

Meios de maturação	Produção de embriões em %
TCM-199	31%
MEMB	25%
MEMB1FSH	24%
MEMB10FSH	25%
MEMO	23%
MEMO1FSH	18%
MEM10FSH	18%

Avaliou-se o efeito do FSH 1ng e 10 ng adicionados ao meio de cultura de maturação dos grupos MEMB e MEMO com a finalidade de comparação dos meios de MIV em relação á produção de embriões *in vitro*. Como meio controle utilizou-se o TCM-199 e o comparou com o meio MEMB, MEMB+1FSH e MEMB+10FSH, MEMO, MEMO+1FSH, MEMO+10FSH (Figura 9).



**Figura 9:** Porcentagem de formação de blastocisto após maturação oocitária *in vitro* nos meios testados.

Os resultados foram expressos em porcentagem e calculados a média de desvio padrão. Letras minúsculas diferentes demonstram diferença significativa entre todos os grupos (ANOVA de 1 via;  $p < 0.05$ ). ANOVA de 2 vias indica que há diferença entre os blocos de tratamento MEMB e MEMO.

Os Meios MEMB+1FSH e MEMB+10FSH, possuem a adição de FSH na composição e são representados pela letra b, o qual nos indica que a produção de embriões nestes meios, independente da concentração usada de FSH com o intuito de melhorar a maturação *in vitro*, não foi tão competente quanto ao meio MEMB (sem FSH) e ao meio controle TCM-199. Indicando, portanto que com relação ao meio de maturação *in vitro* MEMB representado pela letra a, não houve diferença estatística na porcentagem de produção de embriões e formação de blastocistos ao comparar com o meio controle TCM-199. Portanto, o novo meio formulado (MEMB) sem a adição de hormônios; se equipara ao melhor meio de cultivo para maturação *in vitro* (TCM-199), utilizado pela maioria dos laboratórios comerciais.

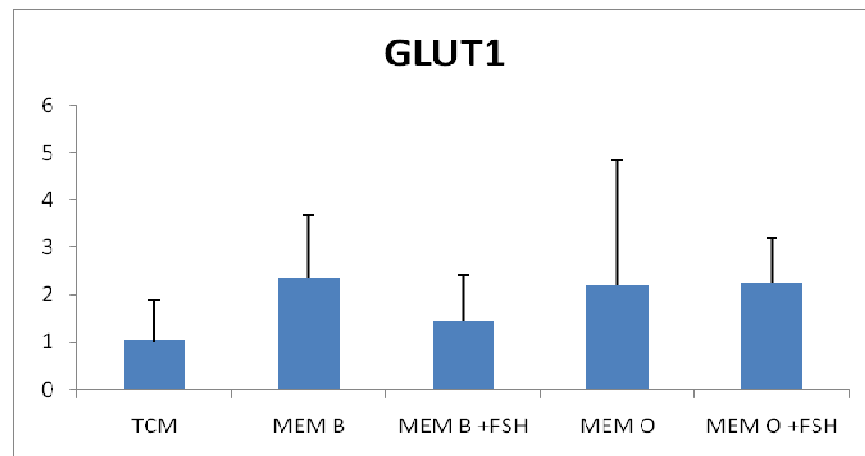
Com relação ao meio MEMO e MEMO+1FSH, representados pela letra c, ambos obtiveram a mesma taxa de porcentagem de produção de blastocistos; indicando que, o meio origem, com apenas o diluente e antibióticos, a produção de embriões não foi alterada neste meio sem FSH e nem com a suplementação de 1ng de FSH, ou seja, baixa concentração de FSH no meio MEMO não foi satisfatória.

O meio MEMO+10FSH representado pela letra d, indica que, houve uma menor produçãoer taxa de blastocistos que todos os outros meios testados, e que a adição de FSH em 10ng neste meio não foi suficiente para alcançar uma melhor competência oocitária e conseqüentemente uma melhor produção de embriões.

A produção de embriões com maturação *in vitro* nos meios definidos MEMB e MEMO, na presença e ausência de FSH (1 e 10ng/ml) foi comparada ao meio TCM199 (meio controle) encontra-se representada na figura 9. Verifica-se a mesma produção de embriões entre o controle e o MEMB. Já o MEMO produz menor quantidade de embriões, comparado ao controle e ao MEMB. A adição de FSH ao meio MEMB reduz a produção de embriões. O meio MEMO produziu a menor porcentagem de embriões, sendo menor pela adição de 10ng /ml de FSH.

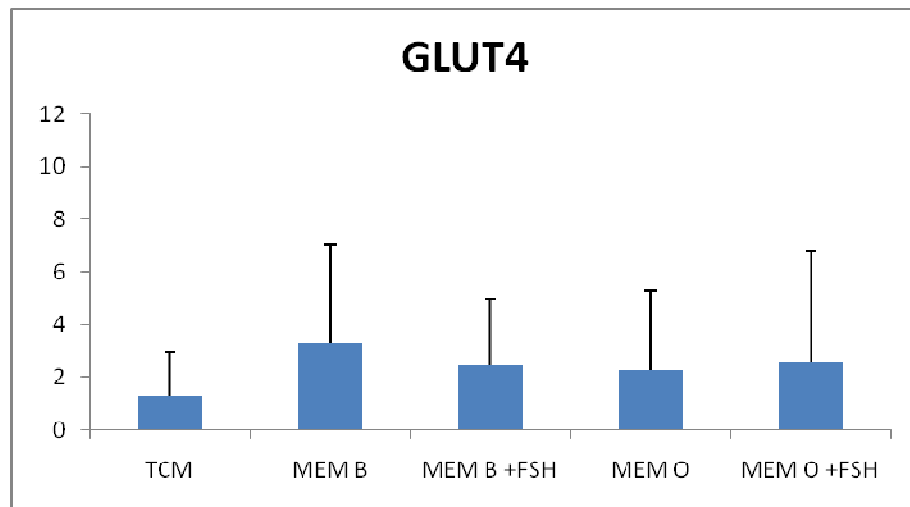
Experimento 4: Análise da abundância relativa de mRNA dos genes marcadores de metabolismo e competência nos embriões produzidos nos meios de maturação *in vitro*.

A expressão do gene GLUT1, transportador de glicose nos embriões produzidos nos meios de maturação *in vitro* foi detectado em todos os grupos, figura 10.



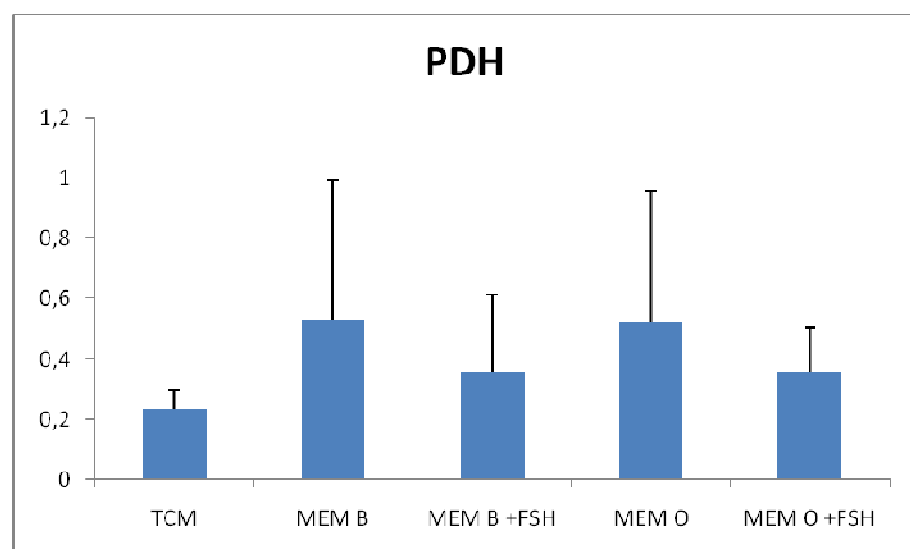
**Figura 10:** A expressão do gene GLUT1, transportador de glicose em embriões, produzidos em óocitos maturados em diferentes meios de cultivo.

A expressão do gene GLUT4, outro transportador de glicose nos embriões produzidos a partir de oócitos maturados nos meios descritos, figura 11.



**Figura 11:** A expressão do gene GLUT4, transportador da glicose em embriões, produzidos a partir de oócitos maturados em diferentes meios de cultivo.

A expressão do gene PDH responsável pelo metabolismo intermediário nos embriões produzidos nos meios de maturação *in vitro*, figura 12.

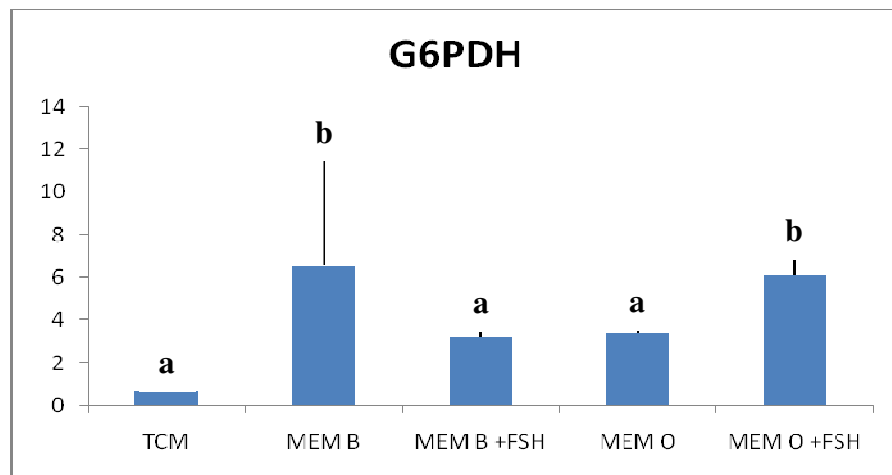


**Figura 12:** A expressão do gene da enzima piruvato desidrogenase (PDH) do metabolismo intermediário nos meios de maturação *in vitro*.



A expressão do gene da enzima glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PDH) responsável pelo metabolismo intermediário nos embriões produzidos a partir de oócitos maturados *in vitro* nos diferentes meios estudados, figura 13.

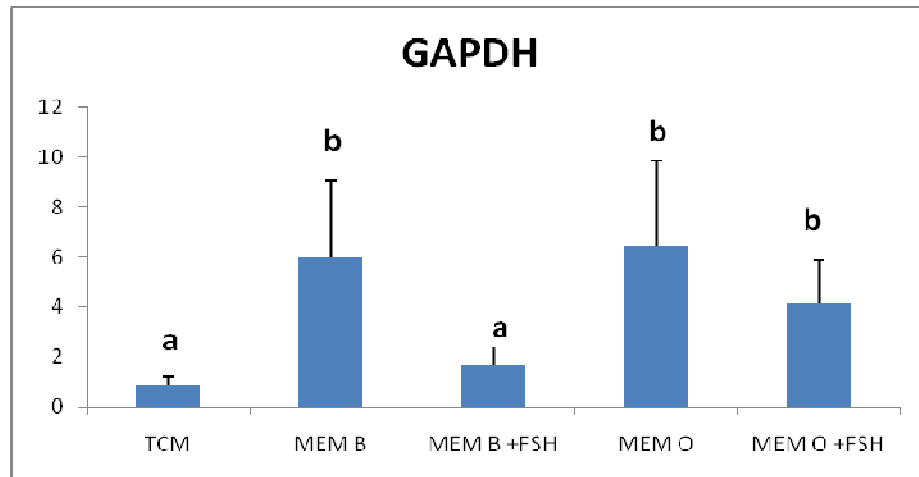
O meio TCM199, MEMB+FSH e MEMO houve menor expressão e não diferem entre si estatisticamente. Nos meios MEMB e MEMO+FSH houve aumento da expressão do gene.



**Figura 13:** A expressão do gene de metabolismo intermediário G6PDH nos meios de maturação *in vitro*. Letras diferentes indicam diferenças entre os grupos  $a \neq b$ .

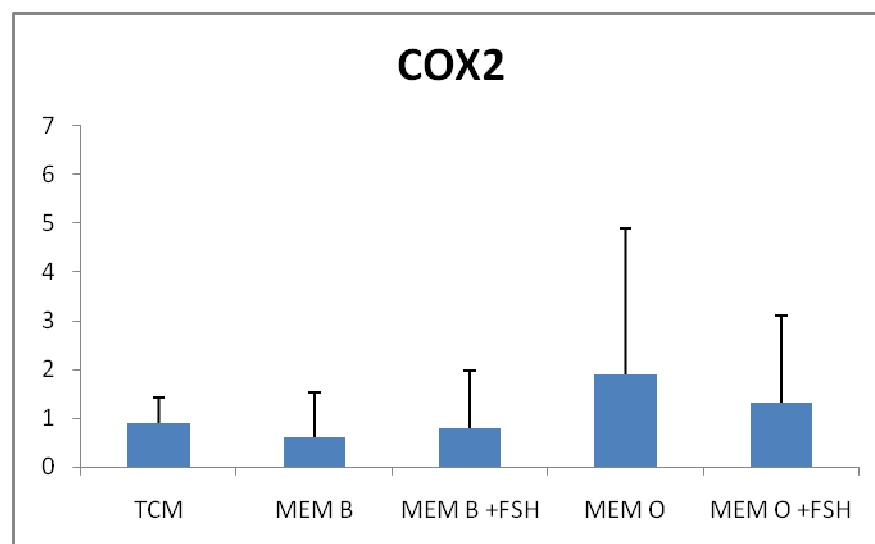
A expressão do gene da enzima glicose fosfato desidrogenase (GAPDH) responsável pelo metabolismo intermediário nos embriões produzidos nos meios de maturação *in vitro*, esta presente em todos os meios propostos para análise. Os dados foram expressos em abundância relativa de mRNA, figura 14.

O meio TCM199, MEMB+FSH obteve baixa expressão e sem diferença estatística. Nos meios MEMB, MEMO e MEMO+FSH foi uma alta expressão. Existe diferença estatística entre os grupos testados.



**Figura 14:** A expressão do gene de metabolismo intermediário GAPDH nos meios de maturação *in vitro*. Letras diferentes indicam diferenças entre os grupos  $a \neq b$ .

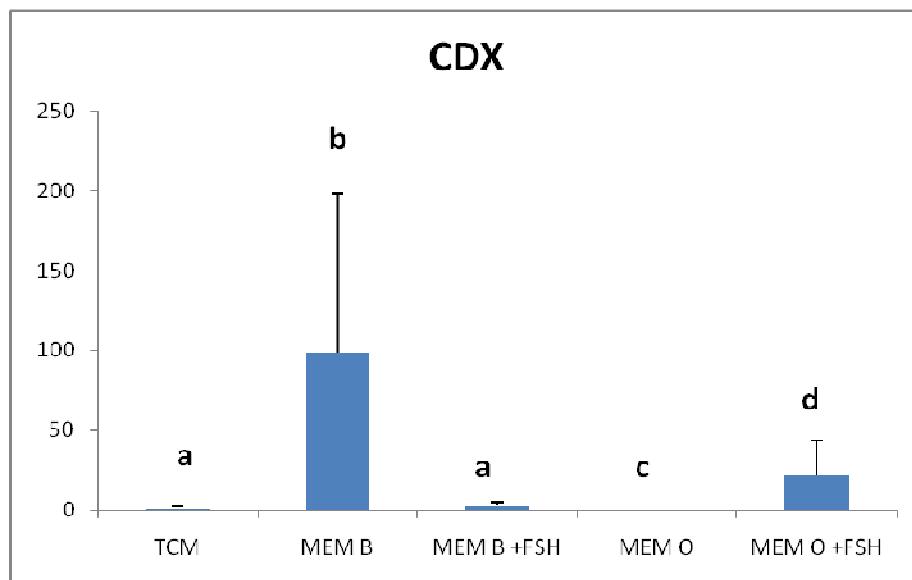
A expressão do gene COX2 um dos indicadores de competência embrionária dos embriões produzidos a partir de oócitos maturados *in vitro* em diferentes meios, esta presente em todos os meios propostos para análise. Os dados foram expressos em abundância relativa de mRNA, figura 15.



**Figura 15:** A expressão do gene de competência embrionária COX2 nos meios de maturação *in vitro*.

A expressão do gene CDX indicativo de competência embrionária dos embriões produzidos a partir de oócitos maturados *in vitro* nos diferentes meios de maturação, esta presente em quase todos os meios propostos para análise. Apenas não foi expresso no meio MEMO. Os dados foram expressos em abundância relativa de mRNA, figura 16.

O meio TCM-199, MEMB+FSH tiveram pouca expressão do gene CDX e desta forma apresentam semelhança entre os meios e não possuem diferença estatística entre eles. No meio MEMB houve uma nítida elevação na expressão do gene, sendo a maior observada quando comparada a todos os outros grupos. No meio MEMO o gene não foi expresso. No meio MEMO+FSH o gene foi levemente expresso.

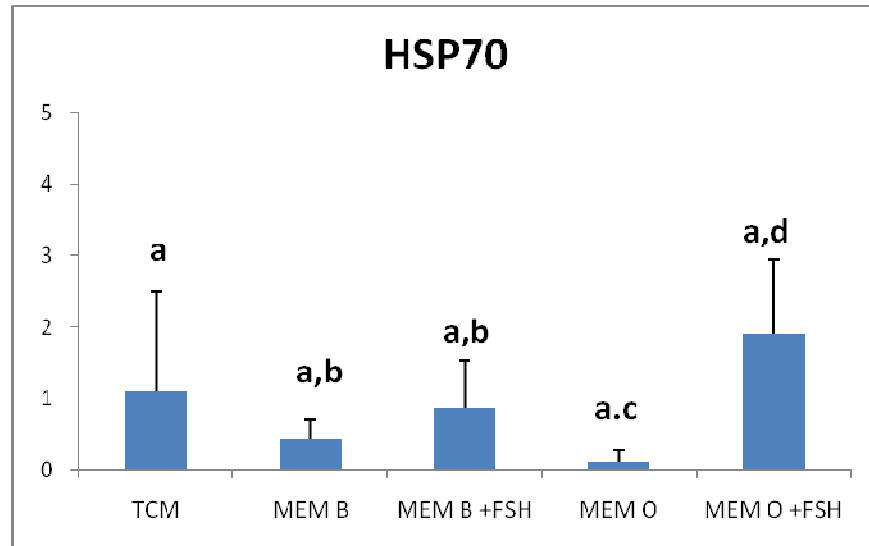


**Figura 16:** A expressão do gene de competência embrionária CDX nos meios de maturação *in vitro*. Letras diferentes indicam diferenças entre os grupos  $a \neq b$ .

A expressão do gene HSP70, um dos marcadores da viabilidade e competência embrionária dos embriões produzidos a partir de oócitos maturados *in vitro* nos diferentes meios estudados, esta presente em todos os grupos. Os dados foram expressos em abundância relativa de mRNA, figura 17.

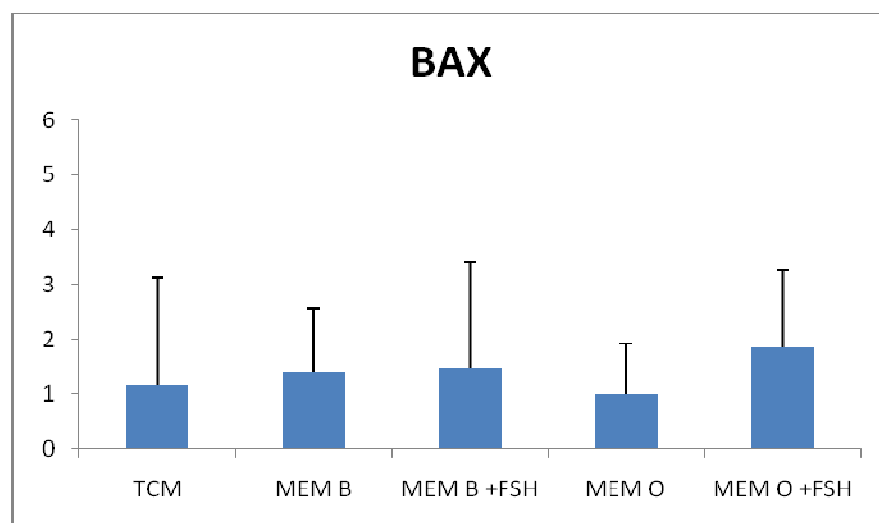
Não houve diferença estatística entre os meios analisados. Foi verificado se há diferença estatística entre os meios do mesmo grupo; sendo que o MEMB e MEMB+FSH são semelhantes; já os meios do grupo MEMO e MEMO+FSH são

diferentes entre si. Apesar de variância na expressão, todos os meios são semelhantes ao meio controle TCM-199, porém uns poucos expressaram e outros com grande expressão do gene.



**Figura 17:** A expressão do gene de competência embrionária HSP70 nos meios de maturação *in vitro*. Letras diferentes indicam diferenças entre os grupos  $a \neq b$ .

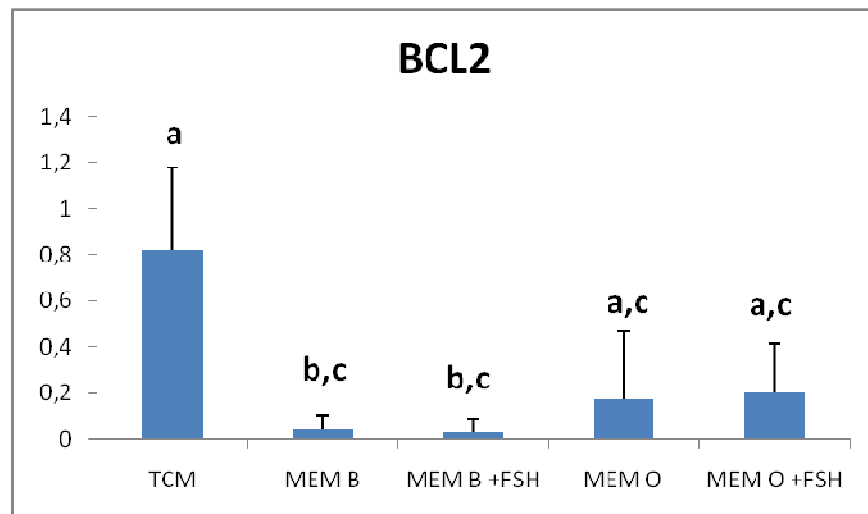
A expressão do gene BAX (pró-apoptótico) marcador de apoptose celular dos embriões produzidos a partir de oócitos maturados *in vitro* nos diferentes meios propostos, esta presente em todos os grupos analisados. Os dados foram expressos em abundância relativa de mRNA, figura 18.



**Figura 18:** A expressão do gene de apoptose celular BAX nos meios de maturação *in vitro*.

A expressão do gene BcL-2 (anti-apoptótico) nos embriões produzidos nos meios de maturação *in vitro*, esta presente em todos os meios propostos para análise. Os dados foram expressos em abundância relativa de mRNA, figura 19.

Apesar do gene BcL-2 ter uma grande expressão no meio TCM-199, não houve diferença significativa com relação aos meios MEMO e MEMO+FSH. Nos meios MEMB e MEMB+FSH, houve a mais baixa expressão do gene. Todos os grupos MEM, apresentam semelhança entre si.



**Figura 19:** A expressão do gene de apoptose celular BcL-2 nos meios de maturação *in vitro*. Letras diferentes indicam diferenças entre os grupos  $a \neq b$ .

## 6 DISCUSSÃO

Nutrientes, atmosfera, osmolaridade e pH são fatores que devem ser bem controlados durante o cultivo *in vitro*, tentando sempre seguir as características mais próximas possíveis do ambiente folicular *in vivo*. O meio mais utilizado na MIV de oócitos bovinos é o tissue culture medium 199 (TCM-199), existindo poucos relatos que sugerem que outro meio possa ser mais apropriado (162). Esse meio é constituído por uma fórmula complexa, originalmente designada para as necessidades metabólicas de células somáticas, particularmente de linhagens celulares. Desta forma, esse meio não é específico para suprir as necessidades complexas e dinâmicas de COCs durante o cultivo de maturação. Esta é uma das principais deficiências na tecnologia da MIV de oócitos, o que leva muitos pesquisadores a realizarem extensas investigações na formulação de meios específicos para tal finalidade, bem como a inclusão de aditivos e suplementos para melhoria do meio e, conseqüentemente, da qualidade dos oócitos cultivados em sistemas *in vitro*. As fontes proteicas mais comumente utilizadas como suplemento do meio de cultura para PIV bovinos são o soro e a albumina sérica bovina (161). No entanto, vários estudos demonstraram a desvantagem da utilização de fontes de origem animal nos meios de PIV, pois esses podem ser veículos para agentes infecciosos e tóxicos para o embrião (163). Ainda entre outras desvantagens, observa-se que geralmente embriões cultivados com soro ou BSA acumulam lipídeos, o que aumenta a sensibilidade à criopreservação (164). Devido a esses fatores, muitos estudos indicam a utilização de meios quimicamente definidos, os quais não têm as desvantagens do soro, mas infelizmente produzem baixas taxas de blastocistos viáveis (164;165).

Os hormônios LH e FSH adicionados no meio de maturação promovem uma melhora na expansão das células do cumulus oophorus (166). O FSH estimula a produção de substâncias sinalizadoras pelas células somáticas, que induzem à retomada da meiose, estimulam a expansão do *cumulus* e, portanto, facilitam a fertilização. O pH das soluções e do fluido celular é crítico para a eficiência de muitos eventos e reações bioquímicas que envolvem o equilíbrio ácido-básico e, devido a isto, influencia a produção de blastocistos. O uso de sistemas tampões em meio de cultivo é necessário para minimizar possíveis variações do pH do meio, que

deve permanecer entre 7,3 e 7,5 durante a maturação de oócitos e o cultivo embrionário. Variações de pH no meio de cultivo, dependendo da amplitude, podem resultar em diminuição dos índices de fecundação e produção de blastocistos, já que a viabilidade celular é afetada.

O sistema tampão empregado na MIV irá depender de o meio ser exposto ao ar atmosférico ou a uma atmosfera controlada. Geralmente a maturação *in vitro* é realizada em 5% CO<sub>2</sub> em ar atmosférico, utilizando-se meio tamponado com bicarbonato de sódio para manutenção do pH em 7,4 sob essas condições. Por outro lado, quando oócitos ou embriões são manipulados em ar atmosférico, a utilização do HEPES N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2-ethanesulphonic acid) mantém o pH de maneira eficiente e mais constante do que a utilização única de bicarbonato. O HEPES foi desenvolvido por Good et al. (1966). Trata-se de um tampão orgânico para pesquisas biológicas. Por ter máxima solubilidade em água, apresentar dificuldade para passar para a membrana celular, não formar complexos com substâncias biológicas, possuir baixa toxicidade, ser estável e não agir como inibidor em reações bioquímicas, é o sistema tampão orgânico mais utilizado para o cultivo de tecidos e células animais. Quando utilizado por curto período de tempo, o HEPES pode ser vantajoso, especialmente quando se trabalha com oócitos e embriões expostos ao ar atmosférico. Por outro lado, estudos recentes mostram que o HEPES pode diminuir o pH intracelular ou levar a uma diferença de incorporação de substratos carbono no RNA e/ou DNA e, assim, pode causar uma alteração no desenvolvimento da competência dos oócitos preservados (167). Por fim, vários estudos têm indicado a suplementação do meio de MIV com fatores recentemente estudados, como fatores de crescimento de diferenciação 9 (GDF-9), fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), Kit ligando (KL), fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), hormônios (FSH, LH, androstenediona), transferrina, selênio e aminoácidos, dentre outros. Cada um desses suplementos está ligado ao melhoramento celular, ao desenvolvimento de mensageiros bioquímicos e aos receptores que se completam para a aquisição da competência final do oócito e, finalmente, para a melhora da PIV de embriões.

A transferrina, além de participar como transportadora de ferro intracelular, também atua como uma molécula desintoxicante removendo metais tóxicos presentes no meio de cultivo celular (168). Além disso, tem ação como estimulante da proliferação celular. O selênio é um importante elemento que atua em vários

processos fisiológicos. Em cultivos celulares, onde há uma alta proporção de oxigênio atmosférico e conseqüentemente uma grande produção de radicais livres, o selênio previne o dano oxidativo reduzindo principalmente a quantidade de radicais livres e diminuindo a peroxidação de lipídeos (168;169). Além disso, o selênio é um constituinte do sítio ativo da enzima glutathiona peroxidase, regulando desta forma sua atividade biológica e indiretamente prevenindo o dano oxidativo nos cultivos celulares (170).

*In vivo* os oócitos passam por várias modificações moleculares e estruturais (capacitação) antes de completar a maturação (devido aos inibidores presentes). *In vitro*, a retomada da meiose ocorre repentina e espontaneamente, independente da competência adquirida. Assim, alguns oócitos reassumem a meiose sem adquirir plena capacitação.

Estudo de inibidores do bloqueio da maturação nuclear que ocorre espontaneamente quando os oócitos são retirados dos ovários para serem cultivados *in vitro*, podem manter o oócito em meiose estacionária. Dessa maneira, pode-se permitir que o desenvolvimento do ooplasma (maturação citoplasmática) e a aquisição da capacitação ocorram de maneira mais semelhante àquela observada *in vivo* (133). Além disso, o bloqueio da meiose é uma importante ferramenta para que se possam estudar os possíveis fatores envolvidos na indução da capacitação após a remoção dos oócitos do ambiente folicular, já que a maturação nuclear do oócito não é suficiente para resultar no subsequente desenvolvimento embrionário. Todavia, convém ressaltar que, nesse tipo de estudo, é importante verificar não só a efetividade das substâncias em inibir o reinício da meiose, mas também sua eficiência na reversibilidade e na ausência de efeitos negativos sobre o desenvolvimento embrionário. O bloqueio da meiose pode ser obtido com o uso de estabilização farmacológica ou com inibidores fisiológicos. Somente após a conclusão dos processos de maturação nuclear e citoplasmática é que o oócito torna-se equipado com toda a maquinaria celular necessária para permitir o sucesso da fertilização e do desenvolvimento embrionário inicial, pois a maturação inadequada, seja do núcleo ou do citoplasma, inviabiliza a fecundação e aumenta as ocorrências de polispermia, de partenogênese e de bloqueio do desenvolvimento embrionário.

Resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa indicam que os grupos de meios MEM bloqueiam a maturação nuclear, enquanto que a citoplasmática progride



(10). Além disso, o perfil esteroidogênico do CCOs cultivado no MEMB indica a capacidade de manter elevada concentração de estradiol, razão E2/P4 e expressão dos receptores de FSH e LH e das enzimas da esteroidogênese, mimetizando uma condição de um folículo ovariano em crescimento. A imaturidade nuclear apresentada, ou seja, a não finalização da meiose, já foi apontada como um ponto benéfico para a progressão da maturação citoplasmática (10), logo temos dados para apontar a importância biotecnológica do meio MEMB para a PIV de bovinos. Estudos anteriores comprovam que a adição de FSH ao meio MEMB não demonstrou efeito nas taxas de produção de embrião *in vitro*, visto que as taxas se assemelham ao usar 1 ou 10ng de FSH (11).

No presente trabalho, foram avaliados meios de maturação *in vitro* quimicamente definidos, patenteados e desenvolvidos no Laboratório de Estudos de Reprodução da Universidade de Brasília. O grande leque de tratamentos foi com o intuito de desenvolver e descobrir, qual dos meios de maturação *in vitro*, capacitam e melhoraram a qualidade dos oócitos maturados, e conseqüentemente atingem uma maior taxa na produção de embriões produzidos *in vitro*. Os efeitos do FSH sobre a maturação *in vitro* de oócitos bovinos têm mostrado efeitos positivos desse hormônio no crescimento folicular em diversas espécies (137). Neste trabalho, o FSH não teve tamanha influência durante a maturação *in vitro*, uma vez que, o meio MEMB sem a suplementação de FSH obteve resultados semelhantes ao meio controle TCM-199. Os grupos de tratamentos com MEMB adicionados com essa gonadotrofina em concentração de 1ng/mL e 10ng/mL apresentaram valores semelhantes entre si. Resultados similares também foram encontrados nos tratamentos de MEMO e MEMO+1FSH, onde os oócitos maturados nestes grupos atingiram a mesma porcentagem de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Observou-se que o FSH na concentração de 1ng/mL não alterou a taxa de produção de embriões quando comparado ao grupo maturado sem FSH. Além disso, no tratamento MEMO+10FSH, observou-se menor produção de embriões comparados com todos os outros tratamentos testados. Vários estudos são controversos quanto a indicação ou não da adição de FSH aos meios de maturação. Rajarajan e colaboradores observaram uma taxa de degeneração em torno de 40% em folículos pré-antrais caprinos isolados e cultivados na presença de FSH por 6 dias. Os resultados obtidos no presente trabalho provavelmente estão relacionados ao fato de ter sido utilizado um meio de base composto por suplementos protéicos,

energéticos, antioxidantes, dentre outros. Acredita-se, dessa forma, que esse meio de base proporcionou um microambiente favorável para manutenção da sobrevivência e competência oocitária. Além disso, a presença de FSH no meio de maturação não permitiu efeitos positivos relacionados ao hormônio. No presente trabalho, os tratamentos com FSH promoveram uma diminuição ou se igualaram a mesma produção de embriões (MEMB+1FSH com MEMB+10FSH sem diferença entre os grupos; MEMO com MEMO+1FSH sem diferença entre os grupos); e quando adicionado 10ng/mL ao meio MEMO a produção de embriões foi a menor de todos os tratamentos. Entretanto, houve diferença estatística ao comparar a produção de embriões entre os grupos de meios MEMB e MEMO. A presença de diferentes fatores presentes no meio MEMB, foram essenciais para o desenvolvimento oocitário.

Dados da literatura demonstram que a taxa de desenvolvimento de oócitos maturados com ou sem proteína é semelhante ou superior a aquela de oócitos maturados na presença de soro (163). Resultados de trabalhos em nosso grupo mostram que tanto o PVA como o PVP-40 podem substituir o BSA ou soro (12). O uso de gonadotrofinas na MIV tem sido considerado importante para o desenvolvimento embrionário e indicado para o meio de maturação embora este uso permaneça ainda controverso. Alguns estudos prévios não mostram efeitos benéficos do FSH e LH sobre o desenvolvimento embrionário de oócitos maturados *in vitro*; embora atualmente haja estudos que indicam a importância do FSH principalmente em baixas concentrações sobre o crescimento *in vivo* (164) de oócitos e sobre a maturação de oócitos *in vitro*. Sabe-se que a maturação do oócito, ou seja, a retomada da meiose até o estágio de metáfase II depende de uma série de fatores. Dentre um dos mais importantes destaca-se o hormônio folículo estimulante (FSH). Essa gonadotrofina tem sido relacionada, juntamente com o hormônio luteinizante (LH) ao início da maturação (165). Alguns estudos sugerem que o FSH influencie também a organização de certas estruturas do citoesqueleto, o que por sua vez seria responsável pela polarização do oócito. Nossos resultados mostram que o FSH pode ser efetivo em meio definido para aumentar o desenvolvimento embrionário MEMB com 1 ou 10ng FSH. Resultados instigantes no presente trabalho nos indicam que a ausência de FSH no meio MEMB faz com que os oócitos maturados neste meio sejam equivalentes ao meio usado como controle. Este estudo contrasta as influências da maturação *in vitro* de oócitos bovinos em

diferentes meios de cultura. Os nossos resultados indicam que o meio MEMB pode ser efetivamente utilizado para maturação oocitária e posteriormente produção de embriões.

Observado por Watson e colaboradores (168), condições sub-ótimas de cultura durante a maturação podem ser restritivas ao desenvolvimento. Nossos resultados demonstram que oócitos bovinos maturados em meio MEMB suplementado com macromoléculas sintéticas, com ou sem gonadotrofina e isento de fatores de crescimento e soro, alcançaram potencial para o desenvolvimento pré-implantação similar à oócitos maturados no meio TCM-199 suplementado com FSH e 10% de soro.

Inversamente ao cultivo em TCM-199 com soro, não foi observada a expansão do *cumulus oophorus* quando os oócitos foram cultivados em meio MEMB, provavelmente devido a ausência do soro (figuras 3, 4 e 5). Estes resultados confirmam os achados de Ali e Sirard (162) em meio SOF suplementado com PVP-40 e indicam que durante a maturação do oócito bovino a expansão do *cumulus* não está diretamente relacionada à expressão de competência citoplasmática (162). Considerando a importância do FSH no desenvolvimento folicular, esta gonadotrofina é frequentemente empregada em meio de MIV na tentativa de tornar o processo de maturação mais efetivo. No entanto, estudos prévios não mostram efeito das gonadotrofinas FSH e/ou LH, na maturação do oócito e desenvolvimento embrionário subsequente e a suplementação do meio de cultura do oócito com gonadotrofinas exógenas ainda é controversa (162).

Este experimento contrasta com outros trabalhos que mostra a importância do meio TCM-199 na maturação oocitária visando a produção de embriões competentes. Tanto os grupos dos meios MEMB e MEMO podem ser perfeitamente utilizados para a MIV, sendo que os grupos de MEMB podem ser considerados melhor, pois o MEMO produz uma menor quantidade de embriões do que o MEMB que produz quantidades de embriões semelhantes ao controle. O FSH 10 ng tem importância quando utilizado no MEMO, pois a produção de embriões neste meio foi pouco menor que nos MEMO sem ou com 1ng de FSH, promovendo uma baixa produção de blastocistos por este meio, ainda desconhecida. As vantagens do meio MEMB em relação ao meio TCM-199 são que, não necessita de SFB, e hormônios LH e FSH, além dele ser quimicamente definido; pode substituir perfeitamente

qualquer meio de maturação existente tanto em laboratórios de pesquisa como comerciais.

De acordo com os resultados, questionamentos surgem em torno dos aminoácidos, transferrina e também do selênio, será que possuem papel de estimulador; esta é uma evidência ao comparar o MEMB, que aumentando a competência de oócitos maturados, levou a uma maior produção de embriões; e o MEMO que não possui aminoácidos, transferrina e nem selênio tiveram uma baixa produção de embriões, e foi ainda menor ao acrescentar o FSH em 10ng. Esta é uma evidência clara do papel de ambos. Os resultados obtidos com o MEMO têm importância fundamental no estudo de fatores estimuladores intervenientes na MIV de oócitos bovinos, em meios cada vez mais simples e definidos.

A expansão das células do cumulus de CCOs, maturados em meio controle TCM-199, comparado ao grupo MEMB, não há uma dimensão exata ou mesmo uma estimativa da capacidade destes oócitos em serem fertilizados e se transformarem em embriões. Ou seja, não é um bom parâmetro, uma vez que caminham em direções opostas (expansão das células do *cumulus* e a produção de embriões). No meio controle TCM-199 houve uma boa expansão das células do *cumulus* e aumento da produção de embriões; já nos meios MEMB, não houve boa expansão das células do cumulus, mas houve a mesma produção de embriões que o meio controle. Assim, a expansão do cumulus não indica maturação oocitária adequada e que não seja tão importante para a produção de embriões, segundo resultados do presente trabalho.

A reprodução é uma das etapas fundamentais da vida de qualquer ser vivo e permite a passagem das características aos seus descendentes, visando a variabilidade genética da população e a perpetuação das espécies. Os gametas sexuais são parte essencial nesse processo e a manutenção de sua viabilidade depende do ganho e do amadurecimento de sua capacidade biológica.

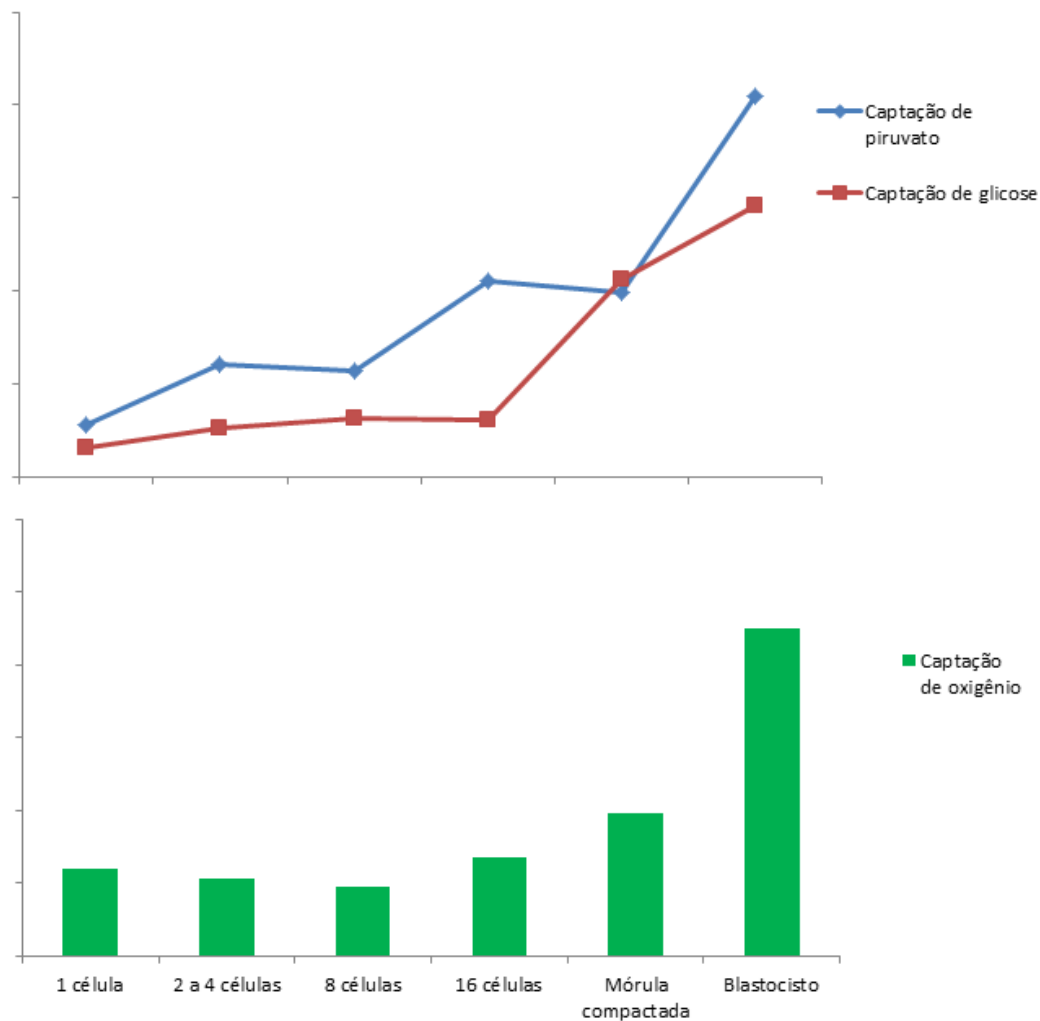
A geração de adenosina trifosfato (ATP) depende da captação de nutrientes do meio, como glicose, piruvato e aminoácidos, e das reservas intracelulares. Embriões bovinos possuem reservas de glicogênio e lipídios, sendo que, o acúmulo de glicogênio em embriões de ruminantes é quase insignificante e a de lipídios

corresponde à maior parte de suas reservas energéticas (59). A relevância das reservas de glicogênio para embriões bovinos permanece obscura.

Pouco é realmente entendido sobre o metabolismo intermediário na fase de pré-implantação. De forma geral, seu gasto energético é pequeno e o metabolismo é prioritariamente aeróbio. A formação de ATP a partir da glicólise (forma anaeróbia) corresponde a apenas 2,6 a 8,7% do total de ATPs produzido, dependendo da fase de desenvolvimento embrionário (76).

Nos estágios de zigoto até a formação de oito células o metabolismo é dependente de piruvato e aminoácidos e pouca glicose é consumida (66), logo conclui-se que há menor necessidade energética (menor capacidade e taxa de glicólise). Já na fase de formação do blastocisto as necessidades energéticas aumentam, logo há maiores taxas de consumo de glicose e piruvato, maior atividade glicolítica e maiores taxas de síntese proteica para o crescimento do embrião (76).

O consumo de glicose é extremamente baixo até a fase de 16 células e eleva-se significativamente na fase de compactação da mórula e na fase de blastocisto (76). Outro ponto importante é que a produção de lactato, que denota a atividade da via glicolítica, eleva-se apenas na fase de blastocisto, juntamente com o consumo de oxigênio, utilizado na via aeróbia, (figura 20) simbolizando o aumento da atividade metabólica embrionária como um todo (76).



**Figura 20: Consumo de glicose, piruvato e oxigênio mensurados nas diferentes fases de desenvolvimento embrionário pré-implantação (mensuração feita em embriões isoladamente) durante o cultivo *in vitro*. Modificado de Thompson e colaboradores (1996).**

Embriões possuem seu próprio pool intracelular de aminoácidos e carreadores que são capazes de transportar aminoácidos do meio para o interior (62).

Como supracitado, em blastocistos bovinos ocorrem algumas mudanças metabólicas que elevam a taxa metabólica como um todo. Há o aumento na captação e utilização de piruvato e glicose e produção de lactato, denotando elevação das necessidades energéticas, portanto, maior velocidade das reações para síntese de ATP e de outros compostos importantes às funções celulares (figura

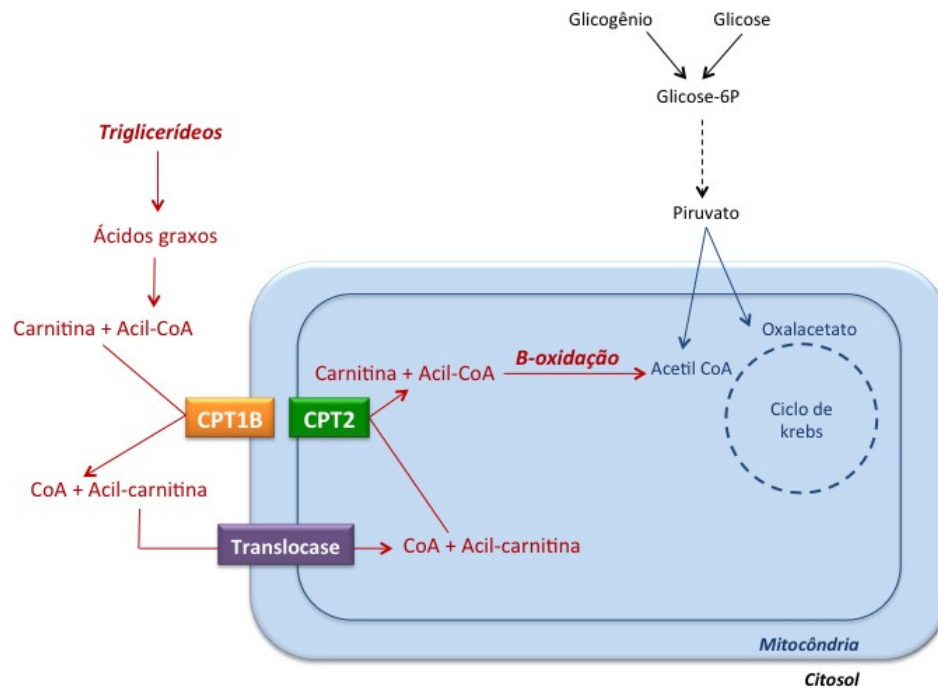
20) (75). Em média, para sustentar o processo de formação da cavidade, chamada de blastocele, 86% do ATP provém da fosforilação oxidativa e 14% da glicólise (78).

A formação da blastocele causa o aumento da atividade da bomba sódio/potássio ATPase ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase), elevando as necessidades energéticas e o consumo de oxigênio. Assim, até a fase de mórula há baixo consumo de oxigênio ( $\text{O}_2$ ); durante a compactação da mórula e formação do blastocisto há aumento de consumo de  $\text{O}_2$  (76). A bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase é responsável por lançar sódio no interior do embrião e que, por osmose, leva a entrada de água, formando a blastocele (51).

Dados provenientes de estudos de embriões de camundongos cultivados em meio que contém aminoácidos não essenciais e glutamina por todo o período de desenvolvimento *in vitro* têm maiores taxas de formação de blastocistos quando comparado aos embriões cultivados em meios sem aminoácidos ou com aminoácidos essenciais. Porém, as maiores taxas de implantação após a transferência foram alcançadas quando, nas primeiras 48 horas de cultivo, o embrião estava num meio que possuía os aminoácidos não essenciais e glutamina e, nas outras 48 horas foram cultivados num meio que possui todos os vinte aminoácidos, sendo comparável inclusive às taxas de gestação obtidas pelos embriões *in vivo* (69). Essas evidências indicam que os aminoácidos possuem funções diferentes e que os não essenciais foram utilizados para gerar ATP e tiveram função protetora, pelo menos no desenvolvimento embrionário de camundongos, ao contrário dos aminoácidos essenciais, que talvez não fossem tão bem metabolizados, inibiriam o desenvolvimento ou competissem pelos mesmos transportadores que os aminoácidos não essenciais (65). Porém, não há evidências de que os aminoácidos substituam por completo outros substratos energéticos como fonte de ATP (ex.: piruvato) ou mesmo que esses resultados sejam reproduzíveis em bovinos, visto que, sabe-se que o perfil metabólico de roedores é diferente de ruminantes.

A inibição da oxidação de lipídios (beta-oxidação) durante a maturação oocitária diminui a taxa de clivagem, de produção de blastócitos e o número de células nessa estrutura embrionária. Além disso, ao longo do desenvolvimento embrionário, a inibição da beta-oxidação diminui o consumo de oxigênio nas fase de

5 a 8 células, porém não afeta blastocistos, podendo estar diretamente relacionado com a diminuição da produção de blastocistos (81).



**Figura 21: Vias de entrada dos ácidos graxos na mitocôndria para a beta-oxidação.** Os triglicerídeos são hidrolisados liberando ácidos graxos. O ácido graxo será primeiramente ligado à molécula coenzima A (CoA) e, posteriormente, à carnitina através da atividade da enzima Carnitina Palmitoil Transferase 1B (CPT1B). O complexo ácido graxo + carnitina (Acil-carnitina) passa pelas cristas mitocondriais através da ação de uma translocase e, em seguida, sofre a ação da enzima Carnitina Palmitoil Transferase 2 (CPT2), liberando novamente o ácido graxo (Acil-CoA). Então, o Acil-CoA será beta-oxidado por enzimas mitocondriais, para gerar Acetil CoA, que entrará no Ciclo de Krebs. Modificado de Sutton-McDowall e colaboradores (155).

A composição do meio ideal permite o desenvolvimento morfológico e número de células adequado ao estágio do embrião, o nascimento de um filhote após a transferência (113) e minimiza o estresse do cultivo *in vitro* (144). Boa parte dos embriões não sobrevive após a transferência, e os que sobrevivem podem desenvolver anomalias e, até mesmo, gerar fetos grandes para a idade gestacional (120). Isso demonstra que o ambiente *in vitro* faz com que o oócito e,



conseqüentemente, o embrião tenha alterações na expressão gênica e na expressão fenotípica de suas características, levando a crer que o ambiente *in vitro* é estressor (155; 76).

Além disso, a influência do meio de cultivo oocitário sobre o desenvolvimento do embrião *in vitro* precisa ser melhor compreendido e, pode-se considerar que ainda não há meios de cultivo cuja efetividade supere os encontrados na literatura e que sejam realmente adequados às necessidades do oócito e do embrião em todas as suas fases de desenvolvimento (64).

As condições de cultura afetam vários parâmetros como a cinética do desenvolvimento, alocação das células do trofoblasto e do embrioblasto na fase do blastocisto, expressão gênica e metabolismo (79). Assim, os meios de cultivo *in vitro* podem ser considerado subótimo para alguns autores (81) ou excessivo para outros (77).

Os embriões de bovinos *in vitro* produzem mais lactato e tem maior taxa oxidativa que os *in vivo*, indicando maior taxa metabólica, enquanto os embriões *in vivo* produzem menos lactato e consomem menos oxigênio. A exposição de embriões gerados no trato uterino à condições *in vitro* aumenta sua taxa glicolítica e produção de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), denotando que as condições de cultivo aumentam a taxa metabólica (119).

Os embriões gerados *in vivo* têm menor taxa metabólica, menor taxa oxidativa, não produzem lactato até a fase embrionária de 16 células e quando produzem, é em menor concentração que os *in vitro* (119). Além disso, os embriões *in vitro* possuem elevada taxa metabólica, quando comparados aos embriões gerados no trato uterino, e o substrato preferencial até o estágio de 12 células é o piruvato. A partir do estágio de 16 células até a fase inicial de formação do blastocisto a glicose passa a ser o substrato preferencial, e após a formação completa do blastocisto a glicose e o piruvato são utilizados de forma conjunta (86).

Os mesmo dados foram obtidos em cultivo de embriões de bovinos na fase de blastocisto, onde também foi observada uma taxa glicolítica elevada após cultivo *in vitro* (76) e que os embriões *in vivo* na mesma fase de desenvolvimento

apresentaram menores taxas glicolíticas que os *in vitro*, denotando que o ambiente de cultivo causa estresse (79).

A expressão do transportador facilitador de glicose GLUT 1 aumenta 15 vezes do estágio de 2 células para o estágio de blastocisto em embriões de roedores *in vivo*, porém nos embriões *in vitro* nos estágios iniciais a expressão é mínima e, até a fase de blastocisto, não ocorre a elevação na expressão que ocorre *in vivo*. Isso denota que *in vitro* o embrião teve menor capacidade de captação de glicose quando comparado ao *in vivo* ou algum tipo de adaptação metabólica pela presença de outros substratos no meio de cultivo (90).

As modificações supracitadas e relacionadas ao metabolismo trazem evidências de que os embriões cultivados *in vitro* possuem um metabolismo que o tornará inviável quando comparado ao embrião *in vivo*. Portanto, as características metabólicas podem ser utilizadas como marcadores da viabilidade embrionária e modificações dos sistemas de cultura devem ser feitas para tornar o embrião cultivado *in vitro* viável. Logo, o embrião gerado *in vitro* deverá possuir o perfil metabólico semelhante ao *in vivo*.

Alterações na expressão de transcritos maternos foram observadas por Watson e colaboradores (109) durante a maturação *in vitro*. Oócitos bovinos maturados em meio desprovido de aminoácidos apresentaram declínio de RNAm da subunidade  $\alpha 1$  da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e da ciclina A. Estas alterações também foram acompanhadas de redução das taxas de desenvolvimento até o estágio de blastocisto (109).

Os resultados demonstram que blastocistos cultivados em diferentes meios de cultura durante a maturação *in vitro*, podem sofrer apoptose. No entanto, níveis apoptóticos não são muito influenciadas pela maturação oocitária. Suplementação de aminoácidos na maturação oocitária é utilizada para aumentar o desenvolvimento do número de células e blastocistos. Os oócitos maturados em meios diferentes expressaram a presença do gene BAX (pró-apoptótico), e não houve diferença representativa e nem importância significativa estatisticamente entre todos os grupos testados ao comparados com o controle TCM-199 (figura 18).

Estudos indicam que quanto menor expressão de GLUT aumenta a apoptose em blastocistos (157). No entanto, não necessariamente, uma maior expressão do BAX indica qualidade inferior dos embriões. A expressão de mRNA dos genes BAX,

BCL-2 não devem ser usados como marcadores para apoptose em embriões bovinos. Os autores trataram embriões bovinos com “staurosporine”, substância indutora de apoptose, e mesmo após o tratamento não foi possível detectar diferença na expressão desses genes. Yang e Rajamahendran (2002) avaliaram a expressão de mRNA dos genes BAX e BCL-2 em oócitos e embriões bovinos com diferentes graus de qualidade, o BAX apresentou-se altamente expresso em todos os tipos de oócitos e embriões, independente do grau de qualidade, já o BCL-2 estava mais expresso nos embriões de boa qualidade. Ambos BAX e BCL-2 apresentaram-se altamente expressos em oócitos desnudos.

Alguns autores defendem a opinião de que a detecção de diferenças na expressão de mRNA somente indica uma significância biológica se confirmada a expressão e a atividade da proteína (112). Caso não seja confirmada presença e atividade da proteína, a expressão de mRNA pode mostrar, apenas, maior atividade celular, ou seja, maior proliferação e crescimento e, como consequência dessa maior atividade, mortes de algumas células também podem ocorrer. Os resultados deste trabalho reforçam a hipótese de que a expressão aumentada do gene BAX pode, simplesmente, indicar maior atividade celular e não necessariamente, qualidade inferior dos embriões, uma vez que a expressão de mRNA do gene BAX foram semelhantes em todos os meios de maturação *in vitro*, e não apresentou diferença estatisticamente. Mas ao relacionar com o BCL-2, percebemos que o meio controle TCM-199 houve a maior expressão do gene, do que todos os outros grupos MEMB e MEMO, que tiveram um hipoexpressão.

Hansen e Fear demonstraram que embriões de duas células são resistentes a apoptose por possuírem a mitocôndria resistente a despolarização em resposta a sinais pró e antiapoptóticos. A inibição da despolarização deve-se a combinação de baixa quantidade de proteínas pró-apoptóticas, como BAX, e ao aumento na concentração da proteína anti-apoptótica BCL2 (117). A ausência de FSH não modifica o padrão de expressão de Bax, porém quando comparado ao VG (CCO imaturo), observa-se menores valores de Bcl-2, mostrando a importância do FSH em termos de expressão gênica desse relevante gene anti-apoptótico. Já foi relatado que o FSH em cultivo mantém o nível de expressão gênica do Bcl-2 em células da granulosa (152).

Uma das alterações causadas por sistemas de cultivo *in vitro* é o desbalanceamento da expressão de importantes genes para o desenvolvimento embrionário. De fato, embriões produzidos *in vitro* demonstram alterações na expressão de alguns genes (27; 33; 49). Alguns desses distúrbios na expressão de genes podem ser associados com o uso do soro no meio de cultivo. A expressão de genes relacionados à resposta ao estresse celular, como a proteína do choque térmico HSP, pode ser alterada pelo cultivo embrionário (48). Além disso, a expressão de HSP tem sido sugerida como um indicador de estresse no ambiente, causado por condições subótimas de estresse (82). No presente estudo, embriões cultivados em diversos meios de maturação *in vitro* não demonstraram alterações significativas na abundância relativa de HSP70, embora todos os grupos não demonstraram diferença significativa estatisticamente em todos os grupos, sendo que o MEMB permaneceu semelhante ao MEMB+FSH. Em relação ao grupo MEMO foi o que obteve menor expressão do gene, e com isso não se assemelha ao MEMO+FSH. Embriões bovinos em diferentes concentrações de soro (1 a 20%) ou com 40% BSA, também não encontraram diferença na expressão relativa de HSP70 entre os tratamentos (45). Esses resultados sugerem que alterações na expressão do gene HSP70 não podem ser associadas à utilização de diferentes meios de tratamento para maturação *in vitro*, tendo em vista que todos os grupos se assemelham ao meio controle.

Apesar de melhorar a maturação oocitária, neste trabalho, o FSH não aumentou a porcentagem de oócitos que alcançaram o estágio de blastocisto. Esse resultado, difere dos dados relatados por Zhang e colaboradores (43) onde a adição de FSH ao meio de maturação aumentou as taxas de embriões bovinos produzidos *in vitro*. A discrepância entre os estudos pode estar relacionada a diversos fatores. O primeiro seria o meio base de maturação utilizado pelo referido grupo, que não foi o mesmo utilizado em nosso experimento. A quantidade de FSH adicionada ao meio foi maior no experimento realizado pelo grupo de Zhang (25 ng/mL) (43) do que neste trabalho (1 e 10 ng/mL). A diferença na quantidade de FSH no meio pode ter influenciado os efeitos do demonstrado que o FSH induz ao melhoramento e competência dos embriões. O efeito da suplementação de FSH na maturação *in vitro* de embriões foi observado também através da quantificação de mRNA *COX2*, *CDX2* em blastocistos. O gene *COX2* é necessário ao processo de alongamento embrionário, resultante da intensa proliferação das células trofoblásticas e

subsequente implantação. A alta expressão de *COX2* no período de implantação embrionária sugere um importante papel das prostaglandinas liberadas pelo embrião em mediar interações com o útero (136). Blastocistos que resultaram em prenhez apresentaram maior expressão do gene *COX2* quando comparados a embriões reabsorvidos depois de serem transferidos (57).

Outro gene analisado, *CDX*, é um fator de transcrição expresso pela trofoectoderma, necessário a implantação e essencial ao desenvolvimento da placenta, motivo pelo qual anomalias embrionárias podem resultar em problemas placentários ou de implantação (154). Assim como o *COX*, o *CDX* é expresso na trofoectoderma e está relacionado ao desenvolvimento da placenta. Ambos apresentaram maior expressão em embriões que obtiveram sucesso ao serem implantados, quando comparados aos que sofreram reabsorção (57). Embriões *CDX* nulos falharam ao implantar, devido a perda da integridade das células epiteliais trofoblásticas e/ou ao aumento de apoptose na trofoectoderma (136).

Neste trabalho, o gene *COX2* foi expresso em todos os meios analisados, e não houve diferença entre eles; ou seja, com relação a competência que confere ao gene *COX2*, os meios testes se comparam ao meio TCM-199 e são validos para um embrião eficiente ao desenvolvimento e prenhez. Com relação ao gene *CDX*, houve uma hiperexpressão no meio MEMB, diferente do grupo MEMB+FSH que foi pouco expresso assim como o controle TCM-199. Os grupos de meios MEMO não houve a expressão do gene, já o MEMO+FSH foi expresso e difere dos outros grupos analisados. Resultados importantes para a literatura com relação ao meio patenteado, pois nele todos os suplementos são de concentrações conhecidas, ou seja, é um meio definido, o que representa um avanço para o seu uso comercial e estudos *in vitro*.

Em termos de regulação, a expressão gênica do GLUT1 é controlada de forma diferente em cada tecido (142). As células endometriais, por exemplo, sob ação da progesterona aumentam a expressão enquanto a exposição ao estradiol ou progesterona e estradiol diminuem a expressão de GLUT1 (141). Em CCOs de camundongo, a suplementação de glicose no meio de cultivo aumenta a presença da proteína (120) e em CCOs suínos a concentração de 5% de oxigênio aumenta a expressão de GLUT1 (150). Desta forma, no presente estudo, o gene GLUT1 se manteve presente em todos os meios analisados e não houve diferença significativa entre eles. O gene referente ao transportador GLUT4 tem sua expressão gênica

bastante estudada, por exemplo, em tecido adiposo e músculo e nos embriões oriundos de maturação da *in vitro* em diferentes meios de cultivo, não houve diferença estatística na expressão do gene em nenhum dos grupos testados.

Em relação às enzimas do metabolismo intermediário, a enzima-chave da via oxidativa de geração de ATP, piruvato desidrogenase (PDH), e a enzima-chave do ciclo das pentoses, glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) foram investigadas nos embriões produzidos nos meios de maturação *in vitro* avaliados. Após o cultivo a expressão de PDH foi menor no meio controle TCM-199, e nos outros tratamentos de maturação definidos não modificaram seu padrão de expressão; mas independente da baixa expressão no grupo controle, não houve diferença estatística entre os tratamentos.

A expressão da enzima G6PDH pode ser regulada pela concentração de oxigênio no cultivo de CCOs (147) e sua atividade mais baixa em oócitos bovinos, está relacionada à melhores taxas de maturação e de produção de embrião *in vitro* (144). A enzima G6PDH está relacionada à retomada e finalização da meiose de oócitos, portanto há uma relação direta entre esses dois parâmetros, pois os substratos energéticos necessários para a meiose provêm da via pentose fosfato (148). Apesar da baixa expressão da enzima no meio controle TCM-199, ela não difere dos tratamentos nos meios MEMB+FSH e MEMO que tiveram pouco maior expressão de transcritos que o meio controle. Os meios MEMB e MEMO+FSH expressaram em maior abundância a enzima e são semelhantes entre si; e diferentes do restante dos meios. Salieta-se que a glicose tem outras vias de metabolização, já que houve semelhança entre o meio MEMB e MEMO+FSH, pode ser que com FSH a glicose seja um dos fatores importante para expansão do *cumulus*, desta forma, pode ser uma possível explicação para as diferenças encontradas. No entanto, a expressão da enzima GAPDH foi pouco expressa no grupo controle TCM-199 e MEMB+FSH. Nos meios MEMB, MEMO e MEMO+FSH, foi abundantemente expressa, sendo semelhante nestes grupos e diferente do controle e MEMB+FSH.

As diferentes condições de maturação *in vitro* influenciam a abundância de transcritos armazenados nos embriões de bovinos, como marcadores moleculares como para viabilizar o uso de embriões *in vitro*. Estas técnicas só poderão ser estabelecidas, após a transferência do embrião, análise das taxas de gestação, *status* da gestação e do parto, bem como a verificação do estado clínico do recém-

nascido, etapas sem as quais é inviável conhecer a real efetividade de cada sistema de cultura.

## 7 CONCLUSÃO

O meio definido MEMB, de maturação de CCOs é eficiente em produzir embriões, na mesma quantidade que o meio controle ou comercial TCM-199.

O meio definido MEMO, de maturação de CCOs, apresentou menor poder de capacitação de oócitos, tendo em vista a menor produção de embriões em MEMO comparado ao TCM e ao MEMB.

A adição de FSH, nos meios definidos de maturação de CCOs (MEMB e MEMO), diminui a capacitação de oócitos maturados, tendo em vista a menor produção de embriões nestes grupos, na presença de FSH.

A expansão das células do cumulus não é indicativa de maturidade funcional ou competência do oócito, uma vez que no MEMB não se encontram expandidas e é onde temos a maior produção de embriões como o controle. O oposto também é verdadeiro, assim, na utilização de FSH nos meios MEMB ou MEMO, há grande expansão do cumulus associada a menor produção de embriões.

A expressão de BAX (pró- apoptótico) não difere entre os grupos de meios de maturação *in vitro*; e a expressão de seu par BCL2 (anti-apoptótico), encontra-se reduzido em todos os grupos cuja maturação foi realizada em meios definidos.

A expressão de COX2 e de HSP70 não é alterada nos meios analisados, no entanto, a expressão de CDX, é abundantemente expresso no meio MEMB.

A expressão dos genes de proteínas associados aos transportadores de Glicose (GLUT1 e GLUT4), de enzima do ciclo das pentoses PDH (Piruvato Desidrogenase), não foi estatisticamente diferente entre tratamentos.

A expressão de G6PDH (glicose 6 fosfato desidrogenase), e de GAPDH, é maior no meio MEMB, e pouco expressa no controle TCM-199.

Portanto, pelo fato do MEMB ser definido, e somente apresentar em sua composição, substâncias cuja concentração é conhecida, como PVA, aminoácidos não essenciais, transferrina e selênio, sendo ausente de hormônios, consideramos que a maturação do oócito neste meio induz o retardo da maturação nuclear e posteriormente produzindo a mesma quantidade de blastocistos.



## REFERÊNCIAS

- 1 - McGEE, E.A; HSUEH, A.J.W. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine reviews* 21:200-214. 2000.
- 2 - TRIPATHI, A., KUMAR, K.V.P., CHAUBE, K. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocyte. *J Cell Physiol* 223:592-600. 2010.
- 3 - ORISAKA, M., TAJIMA, K., TSANG, B. K., KOTSUJI F. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular Development. *Journal of Ovarian Research* 2:9-15. 2009.
- 4- FERREIRA, E.M., VIREQUE, A.A., ADONA, P.R., MEIRELLES, F.V., FERRIANI, R.A., NAVARRO, P.A.A.S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 71:836-48. 2009.
- 5 - WRENZYCKI, C.; HERRMAN, D.; NIEMANN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology* 68S:S77-S83. 2007.
- 6 - SUTTON-McDOWALL, M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction* 139:685-95. 2010.
- 7 - CETICA, P., PINTOS, L., DALVIT, G., BECONI, M. Involvement of enzymes of amino acid metabolism and tricarboxylic acid cycle in bovine oocyte maturation *in vitro*. *Reproduction* 126:753-63. 2003.
- 8 - THOMPSON, J.G. The impact of nutrition of the cumulus oocyte complex and embryo on subsequent development in ruminants. *Journal of Reproduction and Development* 52:169-175. 2006.

- 9 - CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; RAMOS, A.A.; VALE FILHO, V.R. Factors influencing *in vitro* embryo production. *Animal Reproduction*, v. 3, p. 19-28. 2006.
- 10 - OLIVEIRA E SILVA, I. Inibição e reversão da maturação nuclear, avaliação da maturação citoplasmática e produção de esteróides em complexos *cumulus oophorus* bovinos co-cultivados com hemi-seções foliculares em meio de cultura definido. Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília/Faculdade de Medicina, 2008.
- 11 - GULART, L.V.M. Efeito do FSH adicionado aos meios definidos de maturação oocitária sobre o desenvolvimento precoce de embriões bovinos. Dissertação de Mestrado - Universidade de Brasília/Faculdade de Medicina, 2009.
- 12 - VIREQUE, A.A.; CAMARGO, L.S.A.; SERAPIÃO, R.V.; ROSA e SILVA, A.A.M.; WATANABE, Y.F.; FERREIRA, E.M.; NAVARRO, P.A.A.S.; MARTINS, W.P.; FERRIANI, R.A. Preimplantation development and expression of Hsp-70 and Baxgenes in bovine blastocysts derived from oocytes matured in alpha MEM supplemented with growth factors and synthetic macromolecules. *Theriogenology*, v. 71, p. 620-627. 2009.
- 13 - GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; MYLLYMAA, S.; KAIVO-OJA, N.; DRAGOVIC, R.A.; HICKEY, T.; RITVOS, O.; MOTTERSHEAD, D.G. Molecular basis of oocyte paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. *Journal of Cell Science*, v. 119, p. 3811-3821, 2006.
- 14 - VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A. Follicular dynamics in Zebu cattle. *PAB*, v. 35, p. 2501-2509, 2000.
- 15 - ENGELMAN, J.A., LUO, J., CANTLEY, L.C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature*, 7:606-19. 2006.
- 16 - ROBERTS, R.; STARK, J.; IATROPOULOU, A.; BECKER, D.L.; FRANKS, S.; HARDY, K. Energy substrate metabolism of mouse cumulus-oocyte complexes: response to follicle-stimulating hormone is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase

pathway and is associated with oocyte maturation. *Biology of Reproduction* 71:199-209. 2004.

17 - ZHENG, W., NAGARAJU, G., LIU, Z., LIU, K. Functional roles of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3Ks) signaling in the mammalian ovary. *Mol Cell Endocrinol* 356(1-2):24-30. 2012.

18 - DOWNS, S.M., HUMPHERSON, P.G., MARTIN, K.L., LEESE, H.J. Glucose utilization during gonadotropin-induced meiotic maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 44:121-31. 1996.

19 - VASCONCELOS, R.B. Caracterização morfofuncional das células somáticas de folículo ovariano bovino cultivado em meio de cultura definido, não indutor de luteinização. Dissertação de Mestrado - Universidade de Brasília/Faculdade de Medicina, 2008.

20- CHANNING, C.P. Effects of stage of the menstrual cycle and gonadotrophins on the luteinization of Rhesus monkey granulosa cells in culture. *Endocrinology* 87:49-60. 1970.

21- CEPEA, Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada, 2011.

22- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010.

23- IETS 2013, Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. *Embryo Transfer Newsletter*, v. 32 (4) p. 14-26, 2014

24- GALLI, C.; LAGUTINA, I.; CROTTI, G.; COLLEONI, S.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature*, v.424, p.635, 2003.

25- VAN DE LEEMPUT, E.E.; VOS, P.L.A.M.; ZEINSTRA, E.C. et al. Improved in vitro embryo development using in vivo matured oocytes from heifers superovulated with a controlled preovulatory LH surge. *Theriogenology*, v.52, p.335-349, 1999.

26- LONERGAN, P.; FAIR, T. In vitro-produced bovine embryos - Dealing with the warts. *Theriogenology*, v.69, p.17-22, 2008.

- 27- RIZOS, D.; LONERGAN, P.; BOLAND, M.P.; ARROYO-GARCIA, R.; PINTADO, B.; De La FUENTE, J.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biology of Reproduction* 66:589-595. 2002.
- 28- BERTAGNOLLI, A.C.; GONÇALVES, P.B.D.; GIOMETTI, I.C. et al. Interação entre células do *cumulus* e atividade da proteína quinase C em diferentes fases da maturação nuclear de oócitos bovinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, p.488-496, 2004.
- 29- LONERGAN, P., RIZOS, D., GUTIERREZ-ADAN, A., FAIR, T., BOLAND, M.P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Domest Anim* 38, 259-267. 2003.
- 30- RIZOS, D., GUTIÉRREZ-ADÁN, A., PÉREZ-GARNELO, S., DE LA FUENTE, J., BOLAND, M. AND LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod*, v. 68, p. 236-243. 2003.
- 31- AMEISEN, J. C. On the origin, evolution and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ* 4, 367-393. 2002.
- 32- EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122, 829-838. 2001.
- 33- GILCHRIST, R. B., RITTER, L. J., ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci* 82-83, 431-446. 2004.
- 34- MCNATTY, K. P., MOORE, L. G., HUDSON, N. L., QUIRKE, L. D., LAWRENCE, S. B., READER, K., HANRAHAN, J. P., SMITH, P., GROOME, N. P., LAITINEN, M., RITVOS, O., JUENGEL, J. L. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. *Reproduction* 128, 379-386. 2004.

- 35- GILCHRIST, R. B. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. *Reprod Fertil Dev* **23**, 23–31.2011.
- 36- RENESTO, A. Associação das biotécnicas: aspiração folicular guiada por ultrasonografia e superovulação na produção in vitro e in vivo de embriões bovinos. 2004. 59f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.
- 37- LANDIM-ALVARENGA, F.C. Manejo do neonato. In: PRESTES, N.C., LANDIM-ALVARENGA, F.C., (Eds). *Obstetrícia veterinária*. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN, p.158-77, 2006.
- 38 - BEVERS, M.M., IZADYAR, F. Role of growth hormone and growth hormone receptor in oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol* 29:173-8. 2002.
- 39- CHARPIGNY, G., REINAUD, P., TAMBY, J. P., CREMINON, C., GUILLOMOTS, M. Cyclooxygenase-2 unlike cyclooxygenase-1 is highly expressed in ovine embryos during the preimplantation period. *Biol Reprod* **57**, 1032-1040. 1997.
- 40- ROSSANT, J. Stem cells from the mammalian blastocyst. *Stem Cells* **19**, 477-482. 2001.
- 41- S. GUEMRA P.S. MONZANI E.S. SANTOS, R. ZANIN, O.M. OHASHI, M.S. MIRANDA, P.R. *Adona*. Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.65, n.6, p.1616-1624, 2013.
- 42- HENDRIKSEN PJ, VOS PL, STEENWEG WN, BEVERS MM, DIELEMAN SJ.. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. *Theriogenology*. v 53, p. 11-20. 2000.

- 43- RIZOS D, FAIR T, PAPADOPOULOS S, BOLAND M, LONDERGAN P. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. **Mol. Reprod. Dev**, v.62, p.320-327, 2002a.
- 44- GILCHRIST RB, THOMPSON JG. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. **Theriogenology**, v.67, p.6-15, 2007.
- 45- LONERGAN P, FAIR T, CORCORAN D, EVANS AC.. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v 65, p.137-152. 2006.
- 46- SANFINS A, PLANCHA CE, OVERSTROM EW, ALBERTINI DF. Meiotic spindle morphogenesis in *in vivo* and *in vitro* matured mouse oocytes: insights into the relationship between nuclear and cytoplasmic quality. **Hum Reprod**, v.19, p. 2889-2899, 2004.
- 47- WATSON AJ, DE SOUZA P, CAVENEY A, BARCROFT LC, NATALE D, URQUHART J, WESTHUSIN ME. Impact of bovine maturation media on oocyte transcript levels, blastocysts development, cell number and apoptosis. **Biol Reprod**, 62:355-364. 2000.
- 48- WARZYCH E. et al. Maturation medium supplements affect transcript level of apoptosis and cell survival related genes in bovine blastocysts produced *in vitro*. **Mol Reprod Dev.**, v. 74, n.3, Mar, p. 280-9, 2007.
- 49- CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; RAMOS, A.A.; VALE FILHO, V.R. Factors influencing *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction**, v. 3, p. 19-28. 2006.
- 50- RIZOS D, LONERGAN P, BOLAND MP, *et al*. Analysis of differential mRNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. **Biol Reprod.**, v. 66, p. 589-595. 2003.

- 51- CORRÊA GA, RUMPF R, MUNDIM TCD, FRANCO MM. Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: Effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p.132–142, 2008.
- 52- LONERGAN, P., CAROLAN, C., VAN LANGENDONCKT, A., DONNAY, I., KHATIR, H., MERMILLOD, P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. *Biol Reprod* **54**, 1420-1429. 1996.
- 53- LUO, H., KIMURA, K., AOKI, M., HIRAKO, M. Effect of vascular endothelial growth factor on maturation, fertilization and developmental competence of bovine oocytes. *J Vet Med Sci* **64**, 803-806. 2002a
- 54- LUO, H., KIMURA, K., AOKI, M., HIRAKO, M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) promotes the early development of bovine embryo in the presence of cumulus cells. *J Vet Med Sci* **64**, 967-971. 2002b.
- 55- HUSSEIN, T. S., THOMPSON, J. G., GILCHRIST, R. B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev Biol* **296**, 514–521. 2006.
- 56- EI-SAYED, A., HOELKER, M., RINGS, F., SALILEW, D., JENNEN, D., THOLEN, E., SIRARD, M. A., SCHELLANDER, K., TESFAYE, D. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiol Genomics* **28**, 84-96. 2006.
- 57- CROSS, J.; WERB, Z.; FISHER, S. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science*, v. 266, p. 1508–1518, 1994.
- 58- TONG, Z.B.; GOLD, L.; PFEIFER, K.E. et al. Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nat. Genet.*, v.26, p.267-268, 2000.
- 59- SALHAB, M., TOSCA, L., CABAU, C., PAPIILLIER, P., PERREAU, C., DUPONT, J., MERMILLOD, P., UZBEKOVA, S. Kinetics of gene expression and signaling in

bovine cumulus cells throughout IVM in different mediums in relation to oocyte developmental competence, cumulus apoptosis and progesterone secretion. *Theriogenology* 75, 90-104. 2011.

60- VAN DE LEEMPUT, E.E.; VOS, P.L.A.M.; ZEINSTRA, E.C. et al. Improved in vitro embryo development using in vivo matured oocytes from heifers superovulated with a controlled preovulatory LH surge. *Theriogenology*, v.52, p.335-349, 1999.

61- HUMBLLOT, P. et al. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 63, n 4, Mar 1, p. 1149-66. 2005.

62- GARDNER, D.K.; LANE, M.; STEVENS, J.; SCHOOLCRAFT, W.B. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertility and Sterility* 76:1175-1180. 2001.

63- BRINSTER, R.L. Embryo development. *Journal of Animal Science* 38:1003-1012. 1974.

64- FERGUSON, E.M. & LEESE, H.J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *Journal of Reproduction & Fertility* 116:373-378. 1999.

65- LEESE HJ. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reproduction* 143:417-427. 2012.

66- LESSE, H. J. Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. *BioEssays* 24:845-849. 2002.

67- BARNETT, DK e BAVISTER, BD. What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? *Molecular Reproduction and Development* 43:105-133. 1996.



- 68- THOMPSON, J.G.; PARTRIDGE, R.J.; HOUGHTON, F.D.; COX, C.I.; LESSE, H.J. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *Journal of Reproduction & Fertility* 106:299-306. 1996
- 69- STURMEY, R.G. & LEESE, H.J. Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. *Reproduction* 126:197-204. 2003
- 70- DONNAY I e LEESE HJ. Embryo metabolism during the expansion of the bovine blastocyst. *Molecular Reproduction and Development* 53:171-178. 1999.
- 71- WATSON AJ e BARCROFT LC. Regulation of blastocyst formation. *Frontiers in Bioscience* 6: D708-30. 2001.
- 72- WILDING, M.; COPPOLA, G.; DALE, B.; Di MATTEO, L. Mitochondria and human preimplantation embryo development. *Reproduction* 137: 619-624. 2009.
- 73- BAVISTER, B.D. & SQUIRREL, J.M. Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. *Human Reproduction* 15:189-198. 2000.
- 74- WILDING, M.; Di MATTEO, L.; DALE, B. The maternal age: a hypothesis based on oxidative phosphorylation. *Zygote* 13:317-323. 2005.
- 75- ORSI, N.M. & LEESE, H.J. Ammonium exposure and pyruvate affect the amino acid metabolism of bovine blastocysts in vitro. *Reproduction* 127:131–140. 2004.
- 76- THOMPSON JG, SHERMAN AN, ALLEN NW, McGOWAN LT, TERVIT HR. Total protein content and protein synthesis within pre-elongation stage bovine embryo. *Mol Reprod Dev* 50: 139. 1998.

77- LESSE, H. J.; STURMEY, R.G.; BAUMANN, C.G.; McEVOY, T.G. Embryo viability and metabolism: obeying the quiet rules. *Human Reproduction* 22:3047-3050. 2007.

78- LANE, M. & GARDNER, D.K. Selection of viable mouse blastocysts prior to transfer using a metabolic criterion. *Human Reproduction* 11:1975-1978. 1996.

79- LESSE, H. J.; BAUMANN, C.G.; BRISON, D.R.; McEVOY, T.G.; STURMEY, R.G. Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revised. *Molecular Human Reproduction* 14:667-672. 2008.

80- LEESE HJ, DONNAY I, THOMPSON JG. Human assisted conception: a cautionary tale. Lessons from domestic animals. *Human Reproduction* 13:184–202. 1998.

81- KHURANA, N.K. & NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biology of Reproduction* 62:847-856. 2000.

82- WANG, X.; LIU, X-T.; DUNN, R.; OHL, D.A.; SMITH, G.D. Glycogen Synthase Kinase-3 Regulates Mouse Oocyte Homologue Segregation. *Molecular Reproduction and Development*, v. 64, p. 96–105. 2003.

83- LOURO, I. D. Proto-oncogene e gene supressores de tumor. In: LOURO, I.; HERENA JÚNIOR, J. C.; MELO, M. V. S.; ASHTON-PROLLA, P.; CONTORNIFROES, N. *Genética molecular do câncer*, São Paulo, 2002.

84- BURATINI, J., JR., PINTO, M. G., CASTILHO, A. C., AMORIM, R. L., GIOMETTI, I. C., PORTELA, V. M., NICOLA, E. S., PRICE, C. A. Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in bovine follicles. *Biol Reprod* 77, 743–750. 2007

- 85- RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. Regulação da expressão gênica. In: *Genética na Agropecuária*, 2ª ed., Editora UFLA, 472p, 2000.
- 86- MEMILI, E.; FIRST, N.L. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote*, v. 8, p. 87-96. 2000.
- 87- HANSEN, P. J., FEAR, J. M. Cheating death at the dawn of life: Developmental control of apoptotic repression in the preimplantation embryo. *Bioc. Bioph. Research Communications* 413, 155-158. 2011.
- 88- TOMEK, W., SMILJAKOVIC, T. Activation of Akt (protein kinase B) stimulates metaphase I to metaphase II transition in bovine oocytes. *Reproduction* **130**, 423-30. 2005.
- 89- DODE, M., DUFORT, I., MASSICOTTE, L. AND SIRARD, M. Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. *Mol Reprod Dev*, v. 73, p. 288-297. 2006.
- 90- NIEMANN, H. & WRENYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology* 53: 21-34. 2000.
- 91- WRENYCKI, C.; HERRMAN, D.; NIEMANN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology*, 68S, p. S77-S83. 2007.
- 92- KERR, J. F. et al. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. V. 26, n 4, Aug, p. 239-57. 1972.
- 93- OLIVEIRA, A.T.D.; LOPES, R.F.F.; RODRIGUES, J.L. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced *in vitro* with different serum concentrations. *Reproduction Domestic Animals*, v. 41, p. 129–136, 2005.

- 94- PEDERSEN, M.E.; OZDAS, O.B.; FARSTAD, W.; TVERDAL, A.; OLSAKER, I. Effects of bovine oviduct epithelial cells, fetal calf serum and bovine serum albumin on gene expression in single bovine embryos produced in the synthetic oviduct fluid culture system. *Reproduction Fertility and Development*, v. 17, n. 8, p. 751-757, 2005.
- 95- BALASUBRAMANIAN, S.; SON, W.J.; MOHANA KUMAR, B.; OCK, S.A.; YOO, J.G.; IM, G.S.; CHOE, S.Y.; RHO, G.J. Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of *in vitro* and *in vivo* preimplantation bovine embryos. *Theriogenology*, v. 68, p. 265– 275, 2007.
- 96- SAGIRKAYA, H.; MISIRLIOGLU, M.; KAYAC, A.; FIRST, N. L.; PARRISH, J. J.; MEMILI, E. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Animal Reproduction Science*, v. 101, p. 225–240, 2007.
- 97- KNIJN, H.M.; WRENZYCKI, C.; HENDRIKSEN, P.J.M.; VOS, P.L.A.M.; ZEINSTRA, E.C.; VAN DERWEIJDEN, G.C.; NIEMANN, H.; DIELEMAN, S.J. In vitro and in vivo culture effects on mRNA expression of genes involved in metabolism and apoptosis in bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 17, p. 775–784, 2005.
- 98- LAZZARI, G.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; DUCHI, R.; KRUIP, T.; NIEMANN, H.; GALLI, C. Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro* produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biology of Reproduction*, v. 67, p. 767–775, 2002.
- 99- MOORE, T.; REIK, W. Genetic conflict in early development: parental imprinting in normal and abnormal growth. *Review of Reproduction*, v. 1, p. 73-77, 1996.
- 100- YOUNG, L. E.; FAIRBURN, H. R. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. *Theriogenology*, v. 53, p. 627 - 648, 2000.

- 101- RYCKE, M. D.; LIEBAERS, I.; VAN STEIRTEGHEM, A. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies. *Human of Reproduction*, v. 17, p. 2487- 2494, 2002.
- 102- WYLLIE, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, v. 284, n 5756, Apr 10, p. 555-6. 1980
- 103- DUNNE, L.D. et al. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Anim Reprod Sci.* v. 58, n 1-2, Feb28, p. 39-44. 2000.
- 104- COHEN, G.M. Caspases: the execution of apoptosis. *Biochem J*, v. 326, (Pt 1), Aug 15, p. 1-16. 1997.
- 105- SALVESEN, G. S.; DIXIT, V.M. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, v. 91, n 4, Nov14, p. 443-6. 1997.
- 106- BYRNE AT, SOUTHGATE J, BRISON DR, LEESE HJ. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Mol Reprod Dev*, v. 62, p.489-495. 2002.
- 107- PAULA-LOPES FF, CHASE JR CC, AL-KATANANI YM, KRININGER 3RD CE , RIVERA RM, TEKIN S, MAJEWSKI AC, OCON OM, OLSON TA, HANSEN PJ. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. *Reproduction.* V. 125,p. 285- 294. 2003.
- 108- SIRISATHIEN S, HERNANDEZ-FONSECA HJ, BRACKETT BG. Influences of epidermal growth factor and insulinlike growth factor-I on bovine blastocyst development *in vitro*. *Anim Reprod Sci*, v.77, p. 21-32. 2003.
- 109- WATSON AJ, DE SOUZA P, CAVENEY A, BARCROFT LC, NATALE D, URQUHART J, WESTHUSIN ME. Impact of bovine maturation media on oocyte transcript levels, blastocysts development, cell number and apoptosis. *Biol Reprod*, 62:355-364. 2000.

- 110- CUI XS, KIM NH. Maternally derived transcripts: identification and characterization during oocyte maturation and early cleavage. *Reprod Fert Dev.*, v. 19, p.25-34, 2007.
- 111- LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D. *et al.* Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*, v. 65, p. 137-152. 2006.
- 112- YANG, M. & RAJAMAHENDRAN, R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. *Anim Reprod Sci*, v. 70, p. 159-169. 2002.
- 113- MARTINS, N.M. Avaliação do estresse oxidativo e estado redox mitocondrial na hepatotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos Wistar: efeito protetor da dimetiltiouréia. 119p. Tese (doutorado)- Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Ribeirão Preto, 2007.
- 114- LANE M.. Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress *in vitro*. *Theriogenology*. v 55, p. 225-236. 2001
- 115- BETTEGOWDA, A.; PATEL, O.V.; LEE, K. et al. Identification of novel bovine cumulus cell molecular markers predictive of oocyte competence: functional and diagnostic implications. *Biol. Reprod.*, v.79, p.301-309, 2008.
- 116- EDWARDS, J.L., KING, W.A, KAWARSKY, S.J., EALY, A.D. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP 70 and glutathione. *Theriogenology* ;55:209-23. 2001.
- 117- HANSEN, P. J., FEAR, J. M. Cheating death at the dawn of life: Developmental control of apoptotic repression in the preimplantation embryo. *Bioc. Bioph. Research Communications* 413, 155-158. 2011.
- 118- KATO, Y., LI, X., AMARNATH, D., USHIZAWA, K., HASHIZUME, K., TOKUNAGA, T., TANIGUCHI, M., TSUNODA, Y. Comparative gene expression analysis of bovine nuclear-transferred embryos with different developmental potential

by cDNA microarray and real-Time PCR to determine genes that might reflect calf normality. *Cloning Stem Cells* 2007;9: 495-511.

119- KAWARSKY SJ, KING WA. Expression and localisation of heat shock protein 70 in cultured bovine oocytes and embryos. *Zygote*, v.9, p.39-50, 2001.

120- ZHANG B, PEÑAGARICANO F, DRIVER A, CHEN H, KHATIB H. Differential expression of heat shock protein genes and their splice variants in bovine preimplantation embryos. *J Dairy Sci*, v.94, p.4174-4182, 2011.

121- COLLIER RJ, COLLIER JL, RHOADS RP, BAUMGARD LH. Invited review: Genes involved in the bovine heat stress response. *J Dairy Sci*, v.91, p.445-454, 2008.

122- LUFT, J.C., DIX, D.J. Hsp70 expression and function during embryogenesis. *Cell Stress & Chaperones*;4:162-170. 1999.

123 - KREGEL KC. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol*, v.92, p.2177-2186, 2002.

124- GOTOH T, TERADA K, OYADOMARI S, MORI M. Hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ*, v.11, p.390-402, 2004.

125- HANSEN PJ. Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philos Trans R Soc Lond B*, v.364, p.3341-3350, 2009.

126- EDWARDS, J.L., HANSEN, P.J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol. Reprod. Dev.*;46:138-45. 1997

127- CHANDIOLI, R.K., PELTIER, M.R., TIAN, W., HANSEN, P.J. Transcriptional control of development, protein synthesis, and heat-induced heat shock protein 70 synthesis in 2-cell bovine embryos. *Biol. Reprod.*;61:1644-48. 1999

- 128- EALY, A.D., DROST, M., HANSEN, P.J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *J. Dairy Sci.*;76:2899-905. 1993.
- 129- SAKATANI M, ALVAREZ NV, TAKAHASHI M, HANSEN PJ. Consequences of physiological heat shock beginning at the zygote stage on embryonic development and expression of stress response genes in cattle. *J Dairy Sci*, v.95, p.3080-3091, 2012.
- 130- BIGGERS, J.D., LEONOV, B.V., BASKAR, J.F., FRIED, J.. Inhibition of hatching of mouse blastocysts *in vitro* by prostaglandin antagonists. *Biol. Reprod.*, 19, 519-533. 1978.
- 131- LEWIS, G.S. Indomethacin inhibits the uptake of sodium by ovine trophoblastic tissue *in vitro*. *Prostaglandins*, 31, 111-122. 1986.
- 132- LEWIS, G.S. Prostaglandin secretion by the blastocyst. *J. Reprod. Fert.*, suppl. 37, 261-267. 1989.
- 133- GUREVICH, M., SHEMESH, M. Induction of cyclooxygenase and prostaglandin E2 production by the bovine pre-embryos. *Reprod. Fertil. Dev.*, 6, 687-691. 1994.
- 134- SHEMESH, M., MILAGUIR F.; AYALON, N.; HANSEN, W.. Steroidogenesis and protaglandin synthesis by cultured bovine blastocysts. *J. Reprod. Fert.*, 56,181-185. 1979.
- 135- KNISS, D.A.. Cyclooxygenase in reproductive medicine and biology. *J. Soc. Gynecol. Investig.*, 6, 285-292. 1999.
- 136- CHARPIGNY, G., REINAUD, P., TAMBY, J.P., CRÉMINON, C., GUILLOMOT, M. Cyclooxygenase-2 unlike cyclooxygenase-1 is highly expressed in ovine embryos during the implantation period. *Biol. Reprod.*, 57, 1032-1040. 1997.



- 137- GINGER, E.; EXLEY, T.; MCEININNY, A. S.; WARNER C. M. Expression of caspase and BCL-2 apoptotic family members in mouse preimplantation embryos. *Biology of Reproduction*, v. 61, p. 231–239, 1999.
- 138- SIROIS, J.; DORE, M. The late induction of prostaglandin G/H synthase-2 in equine preovulatory follicles supports its role as a determinant of the ovulatory process. *Endocrinology*, v. 138, p. 4427–4434, 1997.
- 139- AROSH, J. A.; PARENT, J.; CHAPDELAINE, P.; SIROIS, J.; FORTIER, M. A. Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, v. 67, p. 161–169, 2002.
- 140- WILSON, J.M.; ZALESKY, D.D.; LOONEY, C.R.; BONDIOLI, K.R.; MAGNESS, R.R. Hormone secretion by preimplantation embryos in a dynamic *in vitro* culture system. *Biol. Reprod.*, 46, 295-300. 1992.
- 141- SAINT-DIZIER, M.; GRIMARD, B.; GUYADER-JOLY, C.; HUMBLLOT, P.; PONTER, A.A. Expression of enzymes involved in the synthesis of prostaglandin E2 in bovine *in vitro*-produced embryos. *Zygote*, 2011.
- 142- STOUT, T. A. E.; ALLEN, W. R. Role of prostaglandins in intrauterine migration of the equine conceptus. *Reproduction*, v. 121, 771–5, 2001.
- 143- SAYRE, B. L.; LEWIS, G. S. Arachidonic-acid metabolism during early development of ovine embryos – a possible relationship to shedding of the zona-pellucida. *Prostaglandins*, v. 45, 557–69, 1993.
- 144- PAKRASI, P. L.; JAIN, A. K. Cyclooxygenase-2 derived PGE2 and PGI2 play an important role via EP2 and PPAR delta receptors in early steps of oil induced decidualization in mice. *Placenta*, v. 29, 523–530, 2008.

- 145- BELL, C. E., CALDER, M. D., WATSON, A. J. Genomic RNA profiling and the programme controlling preimplantation mammalian development. *Mol. Hum. Reprod.* 14, 691-701. 2008.
- 146- CHAWENGSAKSOPHAK, K., GRAAFF, W., ROSSANT, J., DESCHAMPS, J., BECK, F. Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development. *Develop. Bio* 101, 7641-7645. 2004.
- 147- HALL, V. J., RUDDOCK, N. T., FRENCH, A. J. Expression profiling of genes crucial for placental and preimplantation development in bovine *in vivo*, *in vitro*, and nuclear transfer blastocysts. *Mol. Reprod. and Develop.* 72, 16-24. 2005.
- 148- SUTTON-McDOWALL, M.L.; GILCHRIST, R.B., THOMPSON, J.G. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction*, 139, 1-12. 2010.
- 149- PURCELL, S.H.; CHI, M.M. e MOLEY, K.H. Insulin-Stimulated Glucose Uptake Occurs in Specialized Cells within the *Cumulus* Oocyte Complex. *Endocrinology*, v. 153, p. 2444–2454. 2012.
- 150- BIGGERS, J.D., LEONOV, B.V., BASKAR, J.F., FRIED, J. Inhibition of hatching of mouse blastocysts *in vitro* by prostaglandin antagonists. *Biol. Reprod.*, 19, 519-533. 1978.
- 151- HANSEN PJ. Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philos Trans R Soc Lond B*, v.364, p.3341-3350, 2009.
- 152- JOHNSON, M.T., FREEMAN, E.A., GARDNER, D.K. and HUNT, P.A. Oxidative metabolism of pyruvate is required for meiotic maturation of murine oocytes *in vivo*. *Biol Reprod* 77: 2-8. 2007.
- 153- MORITA, Y. e TILLY, J.L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Developmental Biology*, v. 213, p. 1-17. 1999.

154- KUBISTA, M. et al. The Real Time Polymerase Chain Reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, Elmsford NY, v. 27, n. 2-3, p. 95–125, 2006.

155- SUTTON-McDOWALL, M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction*, v. 139, p. 685-95. 2010.

156- KRISHER RL, LANE M, BAVISTER BD. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultures in semi-defined and defined culture media. *Biol Reprod*, v. 60, p.1345-1352. 1999.

157- SUGIYAMA S, MCGOWANB M, KAFIC M, PHILLIPSA N, YOUNG M. Effects of increased ambient temperature on the development of *in vitro* derived bovine zygotes. *Theriogenology*, v.60, p.1039-1047, 2003.

158- MOTA, G. B.; KAISER, D.S.; OLIVEIRA E SILVA, I; TUANY, F.; PEREIRA, M. M.; CAMARGO, L. S. A.; Rosa a Silva, AAM. Insulin influences developmental competence of bovine oocytes cultured in  $\alpha$ -MEM plus follicle-stimulating hormone. *Zygote*, p. 1-10. 2014.

159- VIANA, J.H.M.; DE ALMEIDA CAMARGO, L.; DE MORAES FERREIRA, A.; DE SA, W.; DE CARVALHO FERNANDES, C.; DE PINHO MARQUES JUNIOR, A. 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*, v.84, p.1-12. 2004.

160- PARRISH, J.J. et al. Capacitation on bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* V. 38, p.1170-80,1988.

161- F.P. GOTTARDI, G.Z. MINGOTI. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.33, n.2, p.82-94, abr./jun. 2009. Disponível em [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br)

162 - ALI, A., SIRARD, M.A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation. *Biol. Reprod.*, v.66, p.901-905. 2002.

163- CALDER, M.D.; CAVENEY, A.N.; SMITH, L.C.; WATSON, A.J. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (CCO) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of CCO quality on gonadotropin receptor and Cx 43 marker gene mRNAs during maturation *in vitro*. *Reproduction Biology and Endocrinology*, v. 1, p. 14. 2003.

164 - PONTES, J., NONATO-JUNIOR, I., SANCHES, B., ERENO-JUNIOR, J., UVO, S., BARREIROS, T., OLIVEIRA, J., HASLER, J. AND SENEDA, M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*, v. 71, p. 690-697. 2009.

165- FARIN, P.; CROSIER, A.; FARIN, C. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology*, v. 55, p. 151-170. 2001.

166- KAWARSKY, S. & KING, W. Expression and localisation of heat shock protein 70 in cultured bovine oocytes and embryos. *Zygote*, v. 9, p. 39-50. 2001.

167 - WYLLIE, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, v. 284, n 5756, Apr 10, p. 555-6. 1980.

168- CHANNING, C.P. Effects of stage of the menstrual cycle and gonadotrophins on the luteinization of Rhesus monkey granulosa cells in culture. *Endocrinology* 87:49-60. 1970.

169– COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C.; SÁ, W.F.; COSTA, A.H.A. Tipos morfológicos de oócitos bovinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* V.49 (4), p.417-424,1997.

170- BASSO, V.T.; NASCIMENTO, P.P; CASTILHO,C. EFEITO DO DIÂMETRO FOLICULAR sobre a qualidade dos oócitos obtidos de fêmeas bovinas de abatedouros. *Colloquium Agrariae*, 2: 12-16, 2006.