



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE MEDICINA

LAURA VANESSA MOURÃO GULART

**EFEITO DO FSH ADICIONADO AOS MEIOS
DEFINIDOS DE MATURAÇÃO OOCITÁRIA
SOBRE O DESENVOLVIMENTO PRECOCE DE
EMBRIÕES BOVINOS.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**BRASÍLIA/DF
SETEMBRO/2009**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA**

LAURA VANESSA MOURÃO GULART

**EFEITO DO FSH ADICIONADO AOS MEIOS DEFINIDOS DE
MATURAÇÃO OOCITÁRIA SOBRE O DESENVOLVIMENTO
PRECOCE DE EMBRIÕES BOVINOS.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

ORIENTADORA: ALZIRA AMÉLIA MARTINS ROSA E SILVA

**BRASÍLIA/DF
SETEMBRO/2009**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA**

**EFEITO DO FSH ADICIONADO AOS MEIOS DEFINIDOS DE MATURAÇÃO
OOCITÁRIA SOBRE O DESENVOLVIMENTO PRECOCE DE EMBRIÕES
BOVINOS.**

LAURA VANESSA MOURÃO GULART

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
MÉDICAS NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIAS MÉDICAS.**

APROVADA POR:

**ALZIRA AMÉLIA MARTINS ROSA E SILVA UnB
(ORIENTADOR) CPF: 552.143.208-68**

aamresil@unb.br

**LUCÍLIA DOMINGUES CASULARI ROXO DA MOTTA UNB
CPF: 209.628.276-49**

**ADRIANA LOFRANO ALVES PORTO (UNB)
CPF: 539.985.371-04**

BRASÍLIA/DF SETEMBRO 2009.

FICHA CATALOGRÁFICA

Gulart, L.V.M.

EFEITO DO FSH ADICIONADO AOS MEIOS DEFINIDOS DE MATURAÇÃO OOCITÁRIA SOBRE O DESENVOLVIMENTO PRECOCE DE EMBRIÕES BOVINOS.

106p.: Il.

Dissertação de mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Medicina, 2009.

1. Maturação *in vitro*. 2. Produção de embriões. 3. Biotecnologia. I. Rosa e Silva AAM.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Gulart, L.V.M Efeito do FSH adicionado aos meios definidos de maturação oocitária sobre o desenvolvimento precoce de embriões bovinos. Brasília: Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, 2009, 106p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Laura Vanessa Mourão Gulart

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Efeito do FSH adicionado aos meios definidos de maturação oocitária sobre o desenvolvimento precoce de embriões bovinos.

GRAU: Mestre Ano: 2009

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Laura Vanessa Mourão Gulart

CPF: 048.614.766-58

Endereço: Rua Lírio, n 271, Sagrada Família.

CEP- 39.400-000 Montes Claros/MG – Brasil

Tel: (38) 9156-5700 E-mail: lauravanessamg@yahoo.com.br

"O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto".

Thomas Huxley

*A meus pais, Márcio e Orávia, e meus irmãos Marcelo e Larissa.
Em especial ao meu filho Pedro, Gabriel e Dra. Alzira
incentivadores da minha caminhada e amor dedicado.*

AGRADECIMENTOS

À Deus e a Nossa Senhora, pela vida e proteção, guiando sempre meu caminho.

Aos meus pais que sempre me apóiam, incentivam e torcem pelo meu êxito, fazendo de tudo para que eu possa vencer.

A minha mãe, pelo amor, exemplo e apoio em todas as etapas de minha vida, pessoa fundamental em mais esta conquista.

À toda a minha família e os meus amigos, pessoas que longe ou perto torcem por mim e sempre estarão no meu coração;

Ao meu querido filho Pedro, esta conquista também é sua, você é o grande responsável pela concretização deste sonho, compreendendo minhas falhas e ausências, você é a minha força pra nunca desistir. A mamãe te ama!!!!

A meu anjo e grande amor Gabriel, sempre me incentivando a prosseguir e nunca desistir, dando força, coragem e perseverança para vencer os obstáculos enfrentados. Você faz parte deste trabalho, você faz parte de mim. Te amo!!!

À Prof^a. Dr. Alzira pela incansável busca do conhecimento, sempre disposta a orientar-me e aconselhar-me, por acreditar em mim e no meu trabalho e pelo despertar do gosto pela ciência.

À Lídia e família, obrigado por terem me acolhido quando me mudei para Brasília.

A Embrapa Gado de leite (CNPGL) Juiz de Fora –MG por abrir as portas do seu laboratório, a seus técnicos e estagiários, por me ensinarem os primeiros conhecimentos em embriões.

Ao Dr Luís Sérgio, pela oportunidade de estagiar na Embrapa e sempre se dispor a ajudar para a realização deste trabalho.

A Ingrid e toda a sua família por tornarem agradável a minha estada em Juiz de Fora.

À todos do Laboratório Integrado, pela convivência e amizade durante estes anos;

Às companheiras do laboratório, Ingrid e Rosângela, onde tudo começou. Obrigado pelos ensinamentos.

A Dany Cris, pela amizade, carinho, atenção, lealdade e grande colaboração, não imagino a concretização deste sonho sem a sua participação.

A Dany Kaiser, obrigado por tudo!

Ao Isaque, sempre disposto a nos ajudar.

À professora Anamélia Bocca pelo apoio sempre que necessário.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação, por toda atenção dispensada;

Aos proprietários e funcionários dos matadouros que cederam os ovários para a realização deste trabalho.

A Loise, e Geise pelos ensaios de biologia molecular e auxílio na execução e análise dos dados RT-PCR.

A toda família Rosa e Silva, no momento mais difícil, me apoiaram. Obrigado por tudo!

Ao laboratório Biovitro por ter autorizado e colaborado em parte da execução dos experimentos *in vitro*.

À todos os colegas do Laboratório Biovitro, pelo constante apoio, companheirismo e compreensão na conclusão deste trabalho.

À UnB, FAPDF, PRONEX e CAPES.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- μ PA – ativador de plasminogênio
AMPc - adenosina monofosfato cíclico
ANOVA – análise de variância
ATP - trifosfato de adenosina
Bax – gene pró-apoptótico
Bcl-2 – B cell leukemia/lymphoma 2, anti-apoptótico
BSA - soro albumina bovina
CC – células do cumulus
CCO (s) – complexo cumulus-oócito (s)
CG _ células da granulosa
CGa – célula da granulosa antral
CGm – célula da granulosa mural
CIV – cultivo *in vitro*
CT – célula da teca
Cte – células da teca externa
Cti – célula da teça interna
Cx-43 – conexina 43
E2 - estradiol
FIV- fertilização *in vitro*
FSH: hormônio folículo estimulante
GAPDH - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GDF-9 - fator de crescimento e diferenciação-9
GSH - glutationa
GVBD - quebra da vesícula germinativa
HS – hemi-secções foliculares
Hsa - hialuronato de sódio sintase
IFN-tau – reconhecimento materno

IGF-1 - fator de crescimento semelhante à insulina-1

LH – hormônio luteinizante

LIF – diferenciação celular

MAPK – proteína cinase ativada por mitose

MCI – massa interna celular

MEM - Minimum Essential Medium

MII – metáfase II

MIV – maturação *in vitro*

MPF – fator promotor da maturação

P4 - progesterona

PCR - reação em cadeia da polimerase

PIV – produção *in vitro* de embriões

PVA: álcool polivinílico

PVP-40 – polivinilpirrolidona 40

RNA_m: ácido ribonucléico mensageiro

RT-PCR - do inglês *Reverse Transcription PCR*

SAGE – análise seriada da expressão gênica

SFB – soro fetal bovino

TCM-199 – meio de cultura tecidual 199

TE - trofotoderma

VG – vesícula germinativa

α-MEM – minimum essential medium-alpha

α-MEM B - meio Alfa MEM base (aminoácidos não essenciais, transferrina)

α-MEM C - meio Alfa MEM completo (selênio, IGF-1, insulina, androstenediona)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	20
2.1 <i>Gerais</i>	20
2.2 <i>Específicos</i>	21
3. REVISÃO	22
3.1 Potencial do oócito para o desenvolvimento embrionário	22
3.1.2 <i>Bloqueio meiótico</i>	24
3.1.3 <i>Retomada da meiose e as gonadotrofinas</i>	26
3.2 O complexo cumulus-oócito (CCO)	27
3.2.1 <i>Expansão do Cumulus</i>	28
3.3 Fatores que influenciam a produção de embriões <i>in vitro</i>	31
3.4 Qualidade embrionária	35
3.4.1 <i>Expressão gênica</i>	37
3.5 Morte celular e apoptose em embriões	40
3.6 Sistemas de maturação <i>in vitro</i>	42
3.6.1 <i>Meio TCM-199</i>	42
3.6.2 <i>Meio alfa-MEM (α-MEM)</i>	43
3.6.3 <i>Suplementos: soro, proteínas, hormônios e macromoléculas sintéticas</i>	44
4. A razão de ser deste trabalho: o estado da técnica	46
5. MATERIAL E MÉTODOS	52
5.1 Delineamento experimental	52
5.2 Coleta dos ovários e seleção dos oócitos	54
5.3 Preparo das hemi-seções foliculares	54
5.4 Maturação dos oócitos	54
5.5 Fecundação <i>in vitro</i>	55
5.6 Cultivo <i>in vitro</i>	55
5.7 Determinação da expressão do RNAm dos genes BAX, BCL-2 e Conexina 43	56
5.7.1 <i>Síntese de DNA</i>	56
5.7.2 <i>Reação de polimerização em cadeia</i>	56

5.8 Oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>)	57
5.9 Análise estatística	58
6. RESULTADOS	59
6.1 <i>Experimento 1</i>: Produção <i>in vitro</i> de embriões oriundos da fertilização de oócitos bovinos maturados em meio α-MEMC+PVA+HS, indutores da inibição da maturação nuclear oocitária (OLIVEIRA E SILVA, I 2008).	
6.2 <i>Experimento 2</i>: Esquema temporal de maturação <i>in vitro</i> utilizando pré-maturação-bloqueio (24 horas em meio α-MEMC+PVA) e reversão (24 horas em meio controle TCM-199) 48 horas de MIV: Efeito do FSH adicionado ao meio de maturação α-MEMC+PVA, indutor da inibição da maturação nuclear oocitária, sobre a produção <i>in vitro</i> de embriões oriundos da fertilização destes oócitos bovinos.	64
6.3 <i>Experimento 3</i>: Sistema direto de maturação <i>in vitro</i> (24 horas): Efeito do FSH adicionado ao meio de maturação α-MEMC+PVA, indutor da inibição da maturação nuclear oocitária, sobre a produção <i>in vitro</i> de embriões oriundos da fertilização destes oócitos bovinos.	66
6.4 <i>Experimento 4</i>: Efeito do FSH adicionado ao meio de maturação α-MEMB+PVA, indutor da inibição da maturação nuclear oocitária, sobre a produção <i>in vitro</i> de embriões oriundos da fertilização destes oócitos bovinos.	68
6.5 <i>Experimento 6</i>: Estudo da expressão dos genes de Bax, Bcl-2 e Cx-43 em blastocistos, produzidos após a fertilização de oócitos maturados em meio controle (TCM-199) e o meio α-MEMB+PVA associado ou não ao FSH (1ng ou 10 ng/mL). Resultados preliminares.	72
7. DISCUSSÃO	76
8. CONCLUSÃO	86
9. REFERÊNCIAS	88

ESCLARECIMENTOS

O primeiro meio de cultura definido desenvolvido em nosso laboratório, sob orientação da prof^a. Dra. Alzira Amélia Martins Rosa e Silva, que foi denominado como α -MEMC, está protegido pela deposição de patente no INPI cujo número do protocolo é 012080000612. Outro meio foi desenvolvido pelo nosso grupo e foi chamado de α -MEMB. A patente referente a este último meio esta sob pedido de análise, sendo elaborada. A composição dos dois meios não será apresentada neste trabalho, bem como não haverá divulgação pública dos dados obtidos durante o período previsto de confidencialidade.

Resumo

Condições de cultivo *in vitro* também afetam a produção de embriões e a expressão de importantes genes, podendo alterar a competência de oócitos para a produção de embriões futuros. O FSH em baixas concentrações pode afetar a produção desses embriões. A busca por melhores condições de cultura e um sistema *in vitro* que seja menos variável e ao mesmo tempo em que simule o animal *in vivo*, levou ao desenvolvimento de vários sistemas de cultura para a maturação *in vitro* de oócitos bovinos. Para comparar a eficiência dos sistemas de MIV foram utilizados quatro grupos: 1) TCM-199 controle; 2) α -MEM, 3) α -MEM 1 FSH 4) α -MEM 10 FSH. O meio de cultura do grupo 1, é um meio não definido, devido a presença de soro fetal bovino utilizado. Os grupos dois, três e quatro são definidos, onde foi usado o polyvinilalcohol-PVA como doador de macromolécula sintética. FSH de suíno foi usado nos grupos 1, 3 e 4. No 1^o e 3 grupo o a concentração de FSH foi de 1 ng /mL e no 4 grupo a concentração foi 10ng/mL. Ovários bovinos foram coletados em um abatedouro. Oócitos com citoplasma homogêneo e com mais de três camadas de células da granulosa foram utilizados. Oócitos maduros dos quatro tratamentos foram fertilizados *in vitro* com sêmen preparado pelo método de gradiente Percoll. Prováveis zigotos com até duas ou três camadas de células do cumulus foram cultivados em gotas de 50 μ l de meio SOF, acrescido de 10% de SFB e 1 mg /mL BSA sob óleo mineral em uma atmosfera úmida 5% CO₂ a 38,5 ° C. A taxa de clivagem foi avaliada 72 horas após a FIV, taxa de blastocisto foi avaliada 168-192 horas pós FIV. As taxas de clivagem e blastocisto foram calculados com base no número de oócitos. A expressão dos seguintes genes (Bax, Bcl-2 e Jogadas 43) foram avaliadas, em blastocistos por RT-PCR. O teste de ANOVA foi utilizado para comparar o número de blastocistos. Não houve diferença na proporção de embriões com mais de oito blastômeros em todos os grupos testados, indicando que a taxa de desenvolvimento durante as primeiras 72h pós FIV, foi semelhante nos oócitos maturados em meio quimicamente definido e de oócitos maturados no meio contendo soro. O gene Bax é um marcador pró-apoptóticas e o Bcl um

marcador anti-apoptótico. A conexina 43 (Cx43) pode ser um marcador de competência do embrião. GAPDH foi utilizado como controle interno. O gene Bax não foi expresso em nenhum grupo. Os genes Bcl-2 e da conexina 43 foram expressos, principalmente no α -MEM 10. Resultados inéditos mostram que não foram observadas diferenças na taxa de blastocisto em nenhum dos grupos (30% a 40%), a forte expressão de BCL2 e da Cx43 no grupo contendo 10 ng / mL de FSH podem indicar que FSH pode melhorar a qualidade do embrião, sob condições definidas.

1. INTRODUÇÃO

A produção de um embrião viável depende, primariamente, da síntese e armazenamento de RNAm e proteínas durante o crescimento e diferenciação/maturação do oócito e da mobilização e reorganização dessas moléculas e organelas poucas horas antes do oócito ser liberado do folículo durante a ovulação (MOOR *et al.*, 1998; SIRARD, 2001).

A produção *in vitro* (PIV) de embriões envolve as etapas de captação, maturação (MIV), fecundação (FIV) de oócitos e o cultivo de embriões (CIV). É uma biotécnica de amplo potencial de aplicação para as espécies humana e animal e de grande expressividade tanto para a ciência básica quanto para a aplicada. Apesar dos avanços científicos alcançados nesta área nos últimos anos, o controle exógeno da maturação oocitária ainda constitui um fator limitante na tecnologia de produção de embriões, especialmente nas espécies humana, eqüina e suína, em função dos protocolos de MIV normalmente empregados, citados por VIREQUE *et al.*, 2009. Embora a existência de grande avanço das técnicas para a PIV, a produção de blastocistos para transferência ainda se mantém em torno de 30-40% *in vitro*, enquanto que a produção *in vivo* chega a 80 % (RIZOS *et al.*, 2002a). Há diferenças ainda em termos de qualidade dos embriões e das taxas de prenhez (HOLM e CALLESEN, 1998).

Os sistemas de maturação *in vitro* desenvolvidos e testados nos últimos 20 anos contribuíram para o aumento na qualidade do embrião, porém falharam em alcançar maiores índices de produção (SIRARD, 2001). Substâncias orgânicas de alto peso molecular como o álcool polivinílico (PVA) têm sido utilizadas como substitutos do soro em meios de cultura. A suplementação hormonal durante a MIV, incluindo gonadotrofinas, fatores de crescimento e esteróides, também tem sido investigada e revista. A supressão do soro e a introdução de macromoléculas sintéticas nos meios de cultura têm sido uma tentativa de eliminar os aditivos biológicos incompletamente definidos do meio de cultura, tornando possível uma avaliação mais precisa dos efeitos dos protocolos experimentais na maturação oocitária e o estabelecimento de sistemas de MIV mais próximos do fisiológico (SIRARD; COENEN, 1993; AKTAS *et al.*, 2004; PAVLOK *et al.*, 2005; RUSSELL *et al.*, 2006; THOMPSON, 2006; COLEMAN *et al.*, 2007).

O bloqueio meiótico em um sistema de pré-maturação-reversão(48h de cultivo) tem sido utilizado como forma de permitir ao oócito maior tempo para adquirir a competência antes de submetê-lo à maturação *in vitro*. Embora tal procedimento tenha resultado, na maior parte das vezes em desenvolvimento similar de embriões oriundos de oócitos não submetidos ao sistema de pré-maturação, é considerada importante ferramenta para o estudo do desenvolvimento e diferenciação do oócito (SIRARD, 2001).

A inibição da maturação nuclear espontânea, fenômeno interrompido *in vitro* quando há remoção do oócito do ambiente folicular, leva a finalização da meiose, e é controlada por mecanismos distintos da maturação *in vivo* podendo contribuir para melhorar a competência para o desenvolvimento embrionário.

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 eles, destaca-se o hormônio folículo estimulante (FSH). Essa gonadotrofina está relacionada com o início da maturação e influencia o citoesqueleto e a polarização do citoplasma do oócito. Recentemente, foi sugerido que o cultivo temporário de oócitos em condições menos indutoras de maturação (baixa concentração de gonadotrofinas) podem melhorar a competência para o desenvolvimento de oócitos oriundos de folículos antrais pequenos (FARIN *et al.*, 2007).

O estudo da expressão gênica materna e da organização citoplasmática de oócitos e como estes podem ser influenciados por gonadotrofinas poderão trazer informações importantes acerca do controle da maturação e da aquisição de competência para o desenvolvimento de embriões.

Diversos genes são importantes em processos fisiológicos de desenvolvimento de embriões bovinos. A expressão destes genes que podem ser utilizados como marcadores moleculares, como o Bax, Bcl-2, Glut-5, MnSOD e conexina-43 (Cx-43), estão relacionados à viabilidade do embrião. O Bax é um marcador pró-apoptótico e o Bcl-2 anti-apoptótico. O Glut-5 é um importante transportador de frutose, a MnSOD é uma enzima chave que participa do mecanismo de defesa promovendo a detoxificação das espécies reativas do oxigênio. A conexina-43 é um marcador que indica pró-competência, ou seja, quanto maior a expressão gênica dessa proteína melhor a competência do oócito. Além disso, a conexina é muito expressa nos embriões *in vivo*, por isso pode ser utilizada como indicador de competência (CALDER *et al.*, 2005).

Técnicas de biologia molecular relacionadas à expressão de RNA mensageiro tem sido poderosas ferramentas para a análise da relativa abundância de transcritos envolvidos na qualidade de embriões bovinos (WRENZYCKI *et al.*, 2007). Há inúmeros trabalhos que utilizam a técnica *real time* RT-PCR, uma técnica mais refinada e sensível, para analisar a expressão de genes relacionados à qualidade de embriões bovinos cultivados *in vitro* (MUÑOZ *et al.*, 2009).

Uma das abordagens para aumentar a eficiência das tecnologias da reprodução é desenvolver procedimentos e protocolos que maximizem a competência do oócito e reduzam os índices de falha embrionária e perdas gestacionais. O desenvolvimento de processos para melhorar a competência de oócitos maturados e/ou fertilizados *in vitro* e manipular as respostas do embrião às condições de cultura pode levar a novas práticas para aumentar a sobrevivência embrionária e as taxas de sucesso na reprodução assistida.

Condições de cultivo definido nos quais todos os componentes são conhecidos, ou seja, sem contaminantes, podem nos levar à possibilidade de alterar os sistemas de cultura e obter respostas de grandes repetibilidade. Propusemos-nos a associar a maturação oocitária *in vitro* realizada em meios

de cultura definidos inibidores da meiose (VIREQUE et al 2009., ROSA E SILVA et al.2009, manuscrito em preparação) testando sistemas de pré-maturação (bloqueio meiótico) e reversão (cultivo de 48 horas) e sistemas de inibição da meiose diretos (cultivo por 24 horas). Nosso interesse foi verificar o efeito da adição do FSH em baixas concentrações em meios de cultivo definidos (promotores do bloqueio da meiose – maturação nuclear) sobre o desenvolvimento precoce de embriões oriundos de oócitos maturados *in vitro* nos sistemas testados.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

- Estudar o efeito do bloqueio meiótico oocitário produzido por meio de cultura quimicamente definido e sistema de co-cultura na produção de embriões;

- Estudar os efeitos do FSH (1ng e 10ng) em meio de cultura quimicamente definido α -MEM suplementado com macromolécula sintética – PVA, (α -MEMC e α -MEMB) para maturação oocitária *in vitro*, sobre o desenvolvimento pré-implantação (até a fase de blastocistos).

- Estudar os efeitos do meio de cultura α -MEMB para a maturação oocitária *in vitro* na expressão dos genes Bax, Bcl-2 e da Cx-43 em blastocistos oriundos da fertilização desses oócitos.

2.2 Específicos

1- Analisar a influência do sistema de bloqueio da maturação oocitária em co-cultura com hemisseções foliculares (HS) em meio quimicamente definido α -MEMC acrescido com PVA utilizado como pré-maturação sobre a produção de embriões bovinos cultivados *in vitro* (OLIVEIRA E SILVA, I. 2008).

Este segundo experimento não chegou a ser realizado pelos fatos das HS induzirem a morte dos oócitos.

2- Analisar a influência do FSH adicionado ao meio de maturação α -MEMC+PVA, indutor da inibição da maturação nuclear oocitária, em sistema de pré-maturação (cultivo durante 24 horas em meio definido) + reversão (24 horas em meio controle TCM-199), portanto cultivo durante 48 horas, sobre a produção *in vitro* de embriões oriundos da fertilização destes oócitos.

3- Analisar a influência do FSH adicionado ao meio de maturação *in vitro* (α -MEMC+PVA) em sistema direto – sem reversão (cultivo durante 24 horas) de maturação sobre a produção *in vitro* de embriões.

4- Analisar a influência do FSH adicionado ao meio de maturação *in vitro* (α -MEMB+PVA) em sistema direto – sem reversão (cultivo durante 24 horas) de maturação sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos.

5- Analisar a influência do FSH adicionado ao meio de maturação *in vitro* (α -MEMB+PVA) na expressão dos genes Bax , Bcl-2 e Cx-43 sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos.

3. REVISÃO

3.1 Potencial do oócito para o desenvolvimento embrionário

O termo competência oocitária foi criado para descrever o potencial do oócito para após fertilização dar origem a um embrião de desenvolvimento normal capaz de chegar a termo.

O oócito precisa passar por vários processos maturacionais para dar origem a um embrião capaz de concluir seu desenvolvimento. Entre tais processos estão a aquisição de proteínas receptoras de espermatozóides e de moléculas de sinalização no citoplasma para permitir a fertilização, o acúmulo de reservas intracelulares de cálcio para os eventos de sinalização, a execução do bloqueio à poliespermia, a maturação nuclear com correta segregação dos cromossomos, a aquisição de agentes redutores e outras moléculas requeridas para a descondensação dos pronúcleos, o desenvolvimento do citoesqueleto necessário para a singamia; e a síntese e armazenamento de RNAm, proteínas e outras moléculas envolvidas no desenvolvimento pré-implantação. Fatores que reduzem a competência do oócito atuam em algum ponto do crescimento

ou maturação implicando na execução sub-ótima de um ou mais desses processos (VIREQUE *et al.*, 2009).

A segregação incorreta dos cromossomos é uma causa já documentada da incompetência dos oócitos. A análise de Yadav e colaboradores (1991) mostrou que cerca de 15% dos oócitos cultivados apresentam anormalidades cromossômicas (4,2% aneuplóides e 10,7% diplóides) e interrompem seu desenvolvimento no período de pré-implantação. A incidência de anormalidades cromossômicas é maior em embriões produzidos por fertilização *in vitro* (VIUFF *et al.*, 2001) em comparação à situação *in vivo*. Além disso, algumas das causas de defeitos cromossômicos que são expressos em decorrência das condições de cultura não ocorrem *in vivo*. O cultivo pode causar profundas mudanças na expressão gênica e função do oócito e embrião (DURANTHON; RENARD, 2001).

É provável que proteínas específicas sintetizadas pelo oócito no período de maturação também sejam importantes para o desenvolvimento do embrião. Ainda, fatores como o estresse térmico e os regimes de estimulação hormonal alteram a competência dos oócitos *in vivo*, ao afetarem diretamente o desenvolvimento ou prejudicarem a função das células foliculares que auxiliam no seu desenvolvimento (VIREQUE *et al.*, 2009).

Uma questão ainda não elucidada é quando, ao longo do seu crescimento e desenvolvimento o oócito é mais suscetível a alterações. O tempo estimado para o crescimento de um folículo bovino do estágio primordial até a ovulação é de 84-85 dias (PICTON *et al.*, 1998; MCNATTY *et al.*, 1999), dos quais, aproximadamente, 42 correspondem à fase antral (LUSSIER *et al.*, 1987). Um estresse capaz de induzir lesões no oócito nos estágios iniciais do crescimento folicular pode afetar a fertilidade por um período de tempo considerável após a remoção do estresse. Da mesma forma, alterações induzidas durante o evento maturacional, *in vivo* ou *in vitro*, podem afetar a capacidade fertilizante e de desenvolvimento subsequente do oócito.

Até atingir cerca de 110 a 120 μm de diâmetro, em um folículo de aproximadamente 2 a 3 mm, o oócito participa ativamente da síntese, empacotamento e armazenamento de RNAm que será utilizado pelo embrião em desenvolvimento. Apesar de grande parte do RNAm materno pré-reservado se degradar rapidamente no embrião, é provável que parte de sua síntese

protéica dependa do RNAm materno mesmo após a ativação de seu genoma. Em camundongos, o RNAm materno está presente no estágio de blastocisto, nas regiões do trofotoderma e massa celular interna (BACHVAROVA; MOY, 1985). A não síntese do RNAm pelo oócito em quantidades adequadas para auxiliar no desenvolvimento do embrião pode provocar perda embrionária. Ainda, o RNAm sintetizado pelo oócito para o desenvolvimento embrionário é empacotado de forma que permita seu armazenamento e tradução coordenada em estágios específicos do desenvolvimento (BREVINI-GANDOLFI *et al.*, 1999) A interrupção deste processo também pode comprometer a competência do oócito.

A tradução do RNAm é controlada em parte pela poliadenilação da região 3' não traduzida da molécula de RNAm. Usando avaliação morfológica do ovário para identificar e classificar oócitos de alta e baixa competência, Brevini-Gandolfi e colaboradores (1999) demonstraram que o comprimento da cauda poli-A do RNAm para vários genes era menor em oócitos de baixa competência, sugerindo redução na tradução desses RNAs. Além disso, Lonergan e colaboradores (2000) mostraram que embriões de 2 células que alcançam a primeira clivagem até 30h pós-inseminação são os que têm mais chances de alcançar o estágio de blastocisto e têm a maior quantidade de transcritos de IGF-1, glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD) e hipoxantina-fosforibosil-transferase. Estes resultados demonstram a importância dos RNAs maternos para a competência oocitária.

Vários fatores atuam sobre o oócito imaturo a fim de torná-lo hábil para a fecundação e a produção de um embrião viável. A maturação inadequada do núcleo ou do citoplasma, ou a falta de sincronia entre os dois processos maturacionais pode inviabilizar a fecundação, aumentar as ocorrências de polispermia, de partenogênese ou bloqueio embrionário (BLONDIN *et al.*, 1997).

3.1.2 Bloqueio meiótico

Estudos de Rizos e colaboradores (2002 a,b) demonstraram que a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* seria relacionada ao sistema de cultivo, enquanto que a proporção de oócitos que formam blastocistos seria

relacionada à qualidade intrínseca do oócitos antes mesmo da maturação propriamente dita. Assey e colaboradores (1994) observaram que oócitos de folículos dominantes antes da onda de LH e, portanto, antes da maturação, sofrem modificações nucleares e citoplasmáticas envolvidas com a competência para o desenvolvimento. Hyttel e colaboradores (1997) observaram que *in vivo*, durante o período de crescimento dos oócitos antes de maturação, quando estão inclusos dentro de um folículo também em crescimento, estes sofrem uma série de modificações ultraestruturais. Além disso, os oócitos acumulam transcritos e proteínas necessários para a competência para o desenvolvimento que correspondem à intensa atividade do nucléolo. Quando o oócito atinge o diâmetro de 110 μm , já ao fim da fase de crescimento, o nucléolo é inativado. No entanto, no período entre o final do crescimento do oócito até o pico pré-ovulatório de LH, que estimula a retomada da meiose e início da maturação oocitária, o oócito não entra numa total quiescência, uma vez que ainda ocorrem mais algumas modificações ultraestruturais. Esse intervalo foi denominado de capacitação oocitária e estaria relacionado com a aquisição final de competência para o desenvolvimento pelo oócito (HYTTEL *et al*, 1997).

Nos procedimentos de MIV, usualmente utilizam-se folículos entre 2-6 mm de diâmetro, no entanto, é provável que uma parte considerável desta população seja ainda incompetente para o desenvolvimento. Os oócitos ao serem removidos do ambiente folicular, deixam de receber o estímulo que mantém o bloqueio meiótico e reiniciam espontaneamente a meiose. Este reinício poderia ser, em muitos casos, precoce, ou seja, o oócito ainda não estaria apto para maturar eficientemente e, portanto, para fecundar e desenvolver, por ter tido o seu período de capacitação interrompido (HYTTEL *et al*, 1997; HENDRIKSEN *et al*, 2000; DIELEMAN *et al*, 2002).

Para contornar tal problema os oócitos poderiam passar por um cultivo pré-maturação mantendo os oócitos em bloqueio meiótico, ou seja, mantidos em estágio de vesícula germinativa (VG), o que poderia permitir aos mesmos um tempo adicional para “alcançar” os estágios finais de seu desenvolvimento (LONERGAN *et al*, 1997, 2001; HENDRIKSEN *et al*, 2000). De forma geral, os trabalhos indicam que o bloqueio da meiose *per se*, não é capaz de mimetizar todas as condições a que se submete um oócito dentro do um folículo antes da

maturação, visto que as taxas de desenvolvimento se mantêm, em geral, similares aos controles não tratados (LONERGAN *et al*, 2000; KUBELKA *et al*, 2000; ADONA e LEAL, 2004). De toda forma, o bloqueio da meiose pode ser usado como ferramenta de pesquisa (SANFINS *et al.*, 2004; VIGNERON *et al.*, 2004a,b; LEQUARRE *et al.*, 2004). Gilchrist e Thompson (2007) também sugerem que inibir ou atenuar a maturação meiótica espontânea, que ocorre quando o oócito é retirado do folículo ovariano para procedimentos de maturação *in vitro*, poderia melhorar a competência dos mesmos, visto que quando entram espontaneamente em maturação, o fazem por uma via diferente da maturação induzida por gonadotrofinas como observado *in vivo*. Num estudo recente, WU e colaboradores (2007) observaram que manutenção temporária de oócitos suínos em um ambiente menos “maturacional”, isto é, com baixa concentração de gonadotrofinas, promoveria um efeito favorável em oócitos menos competentes oriundos de folículos antrais pequenos. Esses autores, porém, não avaliaram que efeito tal tratamento poderia ter em oócitos de folículos usualmente utilizados em procedimento de PIV. Mais conhecimentos acerca do oócito e do ambiente folicular a que é exposto *in vivo*, aliado aos dados obtidos de estudo *in vitro*, permitirão o desenvolvimento de condições mais eficientes para a produção de embriões *in vitro*.

3.1.3 Retomada da meiose e as gonadotrofinas

A retomada da meiose caracteriza o início da maturação do oócito. *In vivo*, coincide com um aumento de três vezes nos níveis do hormônio folículo estimulante (FSH) e com um aumento de oito vezes do hormônio luteinizante (LH). Embora o LH seja considerado o principal agente a iniciar a maturação, o FSH parece também exercer um papel importante nesse evento. Foi demonstrado, *in vitro*, que o FSH é capaz de induzir a maturação do oócito (FU *et al*, 2007, ZHANG *et al*, 2007b). Ao associar-se ao seu receptor nas células da granulosa, inicialmente eleva os níveis de AMPc (adenosina monofosfato cíclico) nessas células, ativando a proteína cinase (PKA) dependente de AMPc dos tipos I e II. A ativação da PKA tipo I mantém, num primeiro momento, o oócito em estágio de vesícula germinativa, mas a ativação da PKA tipo II estimula um evento transcricional que resulta mais tarde na quebra da VG,

sinalizando a retomada da meiose (RODRIGUEZ e FARIN, 2007). A retomada da meiose estimulada pelo FSH é dependente de transcrição gênica oocitária (FARIN *et al*, 2007) e da ativação da MAPK (proteína cinase ativada por mitógeno) nas células do *cumulus* (FISSORE *et al*, 1996; SU *et al*, 2001) e no oócito (SU *et al*, 2001). Por outro lado, o LH participa da retomada da meiose por um mecanismo que envolve a interrupção da comunicação entre as células da granulosa com o oócito, impedindo a transferência de AMPc. Essa interrupção mediada pelo LH resultaria de inibição da tradução da Cx-43 bem como na fosforilação dessa proteína mediada pela MAPK. Com a queda dos níveis de AMPc no oócito, este iniciaria a maturação com ativação do MPF (fator promotor da maturação) (GOREN e DEKEL, 1994; DUCKWORTH *et al.*, 2002). Além disso, o LH também é capaz de provocar a queda nos níveis de AMPc via estímulo à liberação de cálcio no oócito. De acordo com Fu e colaboradores (2007) o FSH aumenta a expressão de receptores para o LH nas células do *cumulus*. Recentemente, Eberling e colaboradores (2007) observaram que na maturação *in vitro* induzida por gonadotrofinas, ocorre uma rápida ativação da MAPK nas células do *cumulus* e uma ativação mais lenta no oócito, coincidente com a quebra da VG.

3.2 O complexo *cumulus*-oócito (CCO)

Em mamíferos, o oócito presente no folículo de De Graaf é envolvido por várias camadas de células compactas referidas como células do *cumulus* (CC). As CC são consideradas um subtipo das células da granulosa (CG) e mantêm algumas das características fenotípicas das CG murais, incluindo receptores para gonadotrofinas e síntese de esteróides (GORDON, 1994). O oócito e as CC são metabolicamente interligados pelas junções Gap (JG), possibilitando a entrada de diversos metabólitos no citoplasma oocitário (MOOR *et al.*, 1990). As junções Gap são canais transmembrana formados por hexâmeros de proteínas pertencentes à família das conexinas (Cx) (LOEWENSTEIN, 1987). Moléculas menores que 1.000 daltons podem passar através desses canais, dirigindo-se do citoplasma de uma célula para a célula vizinha. Segundo THOMAS e colaboradores (2004) no momento da punção de folículos entre 3 a

8 mm, 100% das JG entre oócito e as CC estão íntegras. Este valor decresce chegando a aproximadamente 18% após 21 horas de maturação *in vitro*.

Tem sido estabelecido que as CC suportam a maturação do oócito até o estágio de metáfase II e regulam a maturação citoplasmática. Diversos estudos indicam que oócitos desnudos de murinos (BINOR; WOLF, 1979), ovinos (MAGNUSSON *et al.*, 1980) e bovinos (CHIAN *et al.*, 1994) podem alcançar a maturação meiótica *in vitro*. No entanto, a competência para o desenvolvimento de oócitos desnudos é significativamente inferior aos CCOs (KIM *et al.*, 1997). As células do *cumulus* permanecem conectadas ao oócito durante o curso da maturação e não apenas secretam ou transmitem fatores que estimulam efetivamente a maturação do citoplasma, mas desempenham funções importantes para a viabilidade e sobrevivência do oócito. As CC são responsáveis pela transmissão de moléculas ao oócito como o AMPc, e conseqüente bloqueio meiótico, e pela glicólise e produção de piruvato, o principal substrato energético utilizado pelo oócito. As CC também protegem o oócito de danos causados por estresse oxidativo, sintetizando durante a maturação *in vitro*, entre vários fatores, a glutathiona (GSH), um tripeptídeo anti-oxidante que participa de inúmeras reações para eliminar os radicais livres das células. Tatemoto (2000) reportam que CCOs bovinos são menos sensíveis aos sinais apoptóticos induzidos por estresse oxidativo durante a MIV que oócitos desnudos. O estradiol secretado pelo CCO também pode desempenhar uma função essencial nesta situação, já que há evidências que o estradiol inibe a apoptose induzida por estresse oxidativo em tecidos ovarianos (MURDOCH, 1988).

3.2.1 Expansão do *cumulus*

Durante o período pré-ovulatório as CC perdem o contato entre si e com o oócito, porém a integridade do CCO é mantida pela deposição de uma matriz mucoelástica, rica em ácido hialurônico, secretada pelas CC. Proteínas derivadas do soro e sintetizadas pelas CC são requeridas para organizar e manter estáveis os polímeros adjacentes de hialuronato, como um gel altamente estruturado (D'ALESSANDRIS *et al.*, 2001). A formação desta matriz promove um aumento significativo no volume do CCO referido como expansão

do *cumulus*. A enzima responsável pela síntese do ácido hialurônico no CCO é a hialuronato sintase. Recentemente, foram identificados 3 genes codificadores de hialuronato de sódio sintases (Hsa 1, Hsa 2, Hsa 3) em CC murinas, humanas e suínas (ITANO; KIMATA, 1996; SPICER *et al.*, 1996). A expressão da hialuronato sintase nas CC esta diretamente correlacionada com o aparecimento do ácido hialurônico e a expansão do *cumulus* e tem sido avaliada em CCOs eqüinos (MARCHAL *et al.*, 2003), suínos (KIMURA *et al.*, 2002) e murinos (FULOP *et al.*, 1997) após a indução da expansão do *cumulus in vivo* e *in vitro*. O desnudamento fisiológico do oócito subsequente a expansão do *cumulus in vivo* (durante o transporte na trompa uterina) ou *in vitro* depende de proteases (ativadores do plasminogênio) produzidas pelo oócito para desestabilizar a matriz mucificada. Os CCOs são capazes de sintetizar grandes quantidades de ativador do plasminogênio uroquinase (uPA) em resposta ao estímulo gonadotrófico, o qual cliva o plasminogênio na protease plasmina, sua forma ativa (CAMAIONI *et al.*, 1993). Este enzima está envolvida no remodelamento da matriz extracelular em vários tecidos extra-ovarianos e atua na degradação de proteínas requeridas para a organização do hialuronato. O processo de expansão do *cumulus* é regulado diretamente pelo FSH e por fatores parácrinos secretados pelo oócito, como o fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9) (D'ALESSANDRIS *et al.*, 2001). Durante a maturação terminal do folículo, o GDF-9 mantém a integridade estrutural do CCO induzido a hialuronato sintase 2 e suprimindo o ativador do plasminogênio uroquinase (JOYCE *et al.*, 2000).

Evidências indicam que a qualidade oocitária depende de eventos que ocorrem antes da quebra da vesícula germinativa (GVBD), sugerindo que o oócito necessita acumular informações apropriadas para reassumir a meiose, para então ser capaz de fertilizar e produzir embriões antes da condensação cromossômica (SIRARD *et al.*, 2007). Os sinalizadores deste evento estão situados em dois níveis, no crescimento folicular e na manutenção da competência oocitária. O sinalizador é oriundo da diferenciação do folículo e normalmente ocorre em folículos dominantes, próximos a ovulação. O primeiro sinal de diferenciação folicular pode ser mediado pelo FSH circulante, e torna-se possível através de uma ascensão e queda de FSH na circulação, enquanto que o segundo sinal poderia ser parcialmente pelo mesmo hormônio agindo

sobre células do *cumulus* que promovem condições adequadas para o desenvolvimento embrionário (SIRARD *et al.*, 2007).

O processo de expansão do *cumulus* está associado aos mecanismos de extrusão e transporte do oócito na trompa uterina e com a modulação do acesso do espermatozóide ao oócito durante a fertilização (CHERR *et al.*, 1990; CHEN *et al.*, 1993). Embora seja um processo fisiológico facilmente reproduzido *in vitro*, o significado funcional da expansão do *cumulus* durante a MIV ainda não está totalmente elucidado e há dúvidas e controvérsias acerca da importância deste processo na maturação citoplasmática e aquisição de competência do oócito para o desenvolvimento (ALI; SIRARD, 2002).

A utilização de células foliculares e até mesmo de hemisseções foliculares (HS) no meio de maturação, tenta reconstituir *in vitro* o ambiente folicular com intuito de entender como os mecanismos de retomada da meiose, já que os eventos de maturação espontânea e luteinização das CG ocorrem com a retirada do oócito do ambiente folicular. Tais eventos ocorrem pela perda da comunicação oócito-CG realizada via junções Gap (LANUZA *et al.*, 1998; TSAFRIRI e POMERANTZ, 1984). Cheryl (2001) demonstraram que na ausência da Cx-43, a foliculogênese é interrompida antes dos folículos se tornarem multilaminares, causando graves conseqüências para o desenvolvimento dos oócitos. Com a retirada do oócito do ambiente folicular e quebra das junções Gap, ocorre a retomada da meiose, e luteinização das CG. (LONERGAN *et al.*, 1994; DE SOUZA *et al.*, 1998). Estes resultados sugerem que a comunicação oócito-células foliculares está altamente correlacionada com o controle da maturação nuclear.

Foot e Thibault (1969) citado por Sirard (1992), desenvolveram pela primeira vez a co-cultura de HS e oócitos para a análise do estágio de maturação nuclear, e concluíram que o contato entre as células da granulosa e as células do *cumulus* é essencial para a manutenção da VG e prevenção da expansão do *cumulus*. No entanto, Sirard (1992) contradizem esta idéia, concluindo que a ação inibitória das HS na GVBD é diretamente relacionada com a quantidade de tecido presente na co-cultura e não com o contato físico direto entre o oócito e a parede folicular. O co-cultivo de uma HS em 50 μ L de meio de cultivo leva a uma taxa de inibição da GVBD de aproximadamente 50%, enquanto que o co-cultivo de cinco HS no mesmo volume de meio leva a

70% de inibição da GVBD. Portanto, a diferença entre os resultados encontrados pode ser devida ao fato de que o volume de meio de cultura do primeiro experimento não permitiu o acúmulo de quantidade suficiente do inibidor, concluindo que o efeito inibitório da parede folicular é dose dependente, assim como o potencial de reversibilidade do bloqueio meiótico.

3.3 Fatores que influenciam a produção de embriões *in vitro*

As diferenças existentes entre embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* envolvem aspectos morfológicos e moleculares que podem prejudicar a eficiência da PIV. Estas diferenças provavelmente são induzidos por vários fatores, tais como raça, qualidade oocitária, tamanho do folículo, ambiente de cultura etc.

Embriões produzidos *in vitro* geralmente têm alterações na massa celular interna das células, uma coloração mais escura, formação prematura da blastocela, e alterações na expressão gênica e metabolismo celular (THOMPSON, 1997; HOLM & CALLESEN, 1998; LECHNIAK *et al.*, 1998; KHURANA & NIEMANN, 2000; LONERGAN *et al.*, 2006).

Essas alterações podem acarretar distúrbios fenotípicos e ser um dos fatores cruciais para o desenvolvimento do feto com origem *in vitro*. Os fatores maternos contribuem não apenas com metade do material genético, mas também participa das transcrições e proteínas necessárias para o desenvolvimento embrionário inicial do zigoto e embrião. Este ambiente oferece condições citoplasmáticas favoráveis para que o embrião possa ter seu genoma ativado e continuar o seu desenvolvimento. A qualidade oocitária é um fator essencial para a reprogramação da expressão genética considerando ativação do genoma uma chave fundamental para o posterior desenvolvimento embrionário. O ambiente folicular também está relacionado com a qualidade do embrião. Alguns estudos têm encontrado maiores taxas de desenvolvimento embrionário utilizando oócitos de folículos maiores do que 2-3 mm de diâmetro. Hendriksen (2000) relataram que competência oocitária é melhor em folículos maiores que 8 mm.

Estudos têm demonstrado que oócitos com diâmetro superior a 110 μm podem ainda estar em fase de crescimento (FAIR *et al.*, 1995) e são menos capazes de desenvolver após a fertilização. Tem sido sugerido que o que oócitos de folículos associados a 3 milímetros de diâmetro seja um fator crítico (LECHNIAK *et al.*, 2002), sendo também propensas a sofrer alterações nos cromossomos durante a maturação, o que dificulta o seu desenvolvimento (HYTTEL *et al.*, 1997).

Os oócitos mais competentes parecem ser dependentes da idade da doadora. Estudos indicam que novilhas entre 7-11 meses de idade produzem oócitos com competência semelhante à de fêmeas adultas (PRESICCE *et al.*, 1997; MAJERUS *et al.*, 1999). Já oócitos de animais jovens de 3-4 meses de idade foram menos competentes (KHATIR *et al.* 1996, PALMA *et al.*, 2001). O efeito da raça sobre desenvolvimento e competência dos oócitos e embriões é evidente em algumas espécies. Em bovinos, o oócitos de vaca leiteira, influencia a taxa blastocisto (FISCHER *et al.*, 2000; BOEDIONO *et al.*, 2003). O efeito da raça sobre a qualidade oocitária se torna mais evidente quando associada com as condições ambientais. Estudos relataram que vacas Holandesas (*Bos taurus*) produzem oócitos de qualidade inferior às vacas Brahman (*Bos indicus*) durante o verão. É reconhecido que raças *Bos indicus* têm uma grande capacidade de controlar a sua temperatura corporal (HANSEN, 2004). Esta pode ser uma característica genética na adaptação do nível celular que permite o gado *Bos indicus* sobreviver melhor num clima mais quente (PAULA-LOPES *et al.*, 2003), resultando em um maior desenvolvimento oocitário.

Diferenças na produção de blastocisto podem ser notadas também na variação individual de doadoras. Tamassia e colaboradores (2003) encontraram grande variação no número de ovócitos recuperados e na taxa blastocistos, no entanto, um elevado número de ovócitos não necessariamente resulta em uma maior taxa de formação de blastocisto. Portanto, o efeito individual da doadora e a competência oocitária devem ser levados em consideração durante a produção de embriões *in vitro*.

A fecundação *in vitro* é um fator essencial para o sucesso da produção de embriões. A taxa de produção entre os touros são comumente relatados (LARSSON & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000; CAMARGO *et al.* 2002)

Espermatozóides necessitam de ser sujeitos a uma seqüência de modificações fisiológicas (capacitação), que lhes permitem penetrar na zona pelúcida e se fundem com o oócito. Outro aspecto que deve ser levado em conta é a informação genética transmitida por espermatozóides para o embrião. A expressão genética comprometida do espermatozóide pode prejudicar a qualidade e interferir na produção do embrião (LEIBFRIED-RUTLEDGE, 1999).

Ainda há muitas questões envolvendo o ambiente *in vitro* dos oócitos e embriões sobre os efeitos da cultura *in vitro* no desenvolvimento embrionário e características fenotípicas observada na descendência gerada pelos embriões produzidos *in vitro*. Alguns nutrientes têm sido utilizados em meios de culturas, numa tentativa para chegar a atender as exigências nutricionais dos embriões, mas, infelizmente meios de comunicação para o desenvolvimento dos embriões ainda não está otimizado e pode causar alterações moleculares e fenotípicas em embriões, fetos e neonatos (FARIN *et al.*, 2006; LONERGAN *et al.*, 2006).

Atualmente existem diferentes sistemas de cultivo disponíveis para oócitos e embriões *in vitro*. Eles podem ser classificados segundo a sua formulação: (i) indefinido - quando soro e / ou co-cultura são utilizados; (ii) semi-definido onde a co-cultura é omitida e soro é substituído por albumina, (iii) ou totalmente definido - livre-proteína, um sistema onde albumina é substituída por macromoléculas tais como o álcool polivinílico e polivinil pirrolidona (MARQUANT-LE GUINNE & HUMBLLOT, 1998; FARIN *et al.* 2001; VANROOSE *et al.*, 2001).

Um sistema de cultura semi-definido é realizado através da substituição de soro pela albumina, podendo assim eliminar muitos dos componentes potencialmente nocivos do soro (BAVISTER, 1995). Albumina é uma das proteínas de mamíferos prevalentes no trato reprodutivo e pode ter um papel nutritivo durante o desenvolvimento do embrião (THOMPSON, 1997).

Estudos têm demonstrado que embriões bovinos podem ser cultivados em meio livre de soro ou com valores muito baixos de BSA (KRISHER *et al.*, 1999). Outro estudo constatou que o embrião produzido em meio de cultura com BSA tem uma maior viabilidade após vitrificação, em comparação com soro (RIZOS *et al.*, 2003). No entanto, o BSA é ainda um componente biológico sujeito à contaminação que pode prejudicar desenvolvimento embrionário e

fetal, e o seu papel na cultura *in vitro*, não é muito claro (BAVISTER, 1995). Um possível papel da BSA no desenvolvimento embrionário pode ser o de fornecer aminoácidos e substratos para o metabolismo dos embriões, o que poderia favorecer o seu desenvolvimento (ORSI & LEESE, 2004). Recentemente, estudos relataram alterações no desenvolvimento gestacional precoce de placentas quando embriões foram cultivados em um sistema semi-definido, no entanto, os defeitos podem estar associada a BSA de diferentes empresas (PETERSON & LEE, 2003). Foi demonstrado que oócitos de bovinos podem ser fertilizados em sistemas definido de cultivo *in vitro* de embriões (PINYOPUMMINTR & BAVISTER, 1991; KESKINTEPE *et al.* 1995; HOLM *et al.*, 1999). A vantagem deste sistema é que ele elimina os potenciais efeitos nocivos do soro, da co-cultura, e da albumina sobre embriões fertilizados *in vitro*, permitindo um melhor controle das condições cultura e facilitando estudos para avaliar as exigências do embrião.

Uns dos principais substratos energéticos consumidos pelas células é a glicose, porém efeitos nocivos sobre o desenvolvimento precoce em pré-implantação de embriões mamíferos foram descritos (BAVISTER, 1995). Piruvato e lactato são os preferenciais substratos energéticos consumidos pelo embrião *in vitro* (PINYOPUMMINTR & BAVISTER, 1996). Em fase de clivagem, a glicose pode prejudicar o desenvolvimento embrionário, inibindo a fosforilação oxidativa através de metabólitos da via glicolítica (BAVISTER, 1995). O aumento da concentração de glicose também pode causar desvio de embriões masculinos ao feminino (BREDBACKA & BREDBACKA, 1996) por retardar o desenvolvimento dos embriões do sexo feminino. O uso de aminoácidos em meios de cultura isentos de soro melhora o desenvolvimento embrionário (PINYOPUMMINTR & BAVISTER, 1996, LEE *et al.*, 2004), provavelmente através da ação de um antioxidante (LIU & FOOTE, 1995) e controla o pH e a osmolaridade. Aminoácidos podem também reduzir o estresse provocado pela fragmentação celular no embrião (GARDNER, 1998).

A tensão de oxigênio dos embriões de mamíferos se encontra entre 3,5 a 8% (FISCHER & BAVISTER, 1993). O efeito positivo de baixa tensão de oxigênio em a cultura de embriões têm sido relatado para muitas espécies. A redução da tensão de oxigênio a 5% também foi demonstrado que melhora o

desenvolvimento de embriões bovinos fertilizados *in vitro*. O máximo de oxigênio pode afetar a transição materno zigótico (LEQUARRE *et al.* 2004) e provocar apoptose em células embrionárias (YUAN *et al.*, 2003) e / ou alterar o padrão de expressão gênica (HARVEY *et al.* 2004). Mínimo de oxigênio na cultura de embrião pode contribuir para a redução na formação do radical livre. Radicais livres podem prejudicar desenvolvimento e o metabolismo do embrião (LANE, 2001).

3.4 Qualidade embrionária

Durante o período de pré implantação embrionária ocorrem alguns eventos significativos como a iniciação e a continuação da clivagem, ativação do genoma embrionário, agregação e compactação de blastômeros, diferenciação do trofoblasto e embrioblasto, formação e expansão da blastocèle e rompimento da zona pelúcida. Esses fenômenos ocorrem durante o desenvolvimento embrionário *in vitro* e podem ser afetados por uma variedade de fatores intrínsecos e extrínsecos associados às condições de cultura durante a MIV do oócito e/ou o cultivo *in vitro* dos embriões, como íons inorgânicos, tampões, tensão e composição da atmosfera gasosa, aminoácidos, pH, fatores de crescimento, luminosidade,, vitaminas e macromoléculas (VIREQUE *et al.*, 2009).

Durante a última década muitos esforços foram reunidos no sentido de aumentar o índice e a qualidade dos embriões produzidos *in vitro*. O principal problema na tecnologia de embriões é a diferença na qualidade entre embriões produzidos *in vitro* e embriões produzidos *in vivo*. Conseqüentemente, métodos mais precisos para a avaliação da qualidade embrionária são de grande importância. O desenvolvimento do oócito em blastocisto tem sido utilizado como parâmetro para avaliar a competência oocitária, no entanto não traz informações suficientes sobre a qualidade do embrião produzido. A eclosão também tem sido utilizada em muitos estudos como a indicação da competência para o desenvolvimento de blastocistos produzidos *in vitro* (BAVISTER, 1995), sendo um bom indicador da viabilidade do oócito/embrião (CAMARGO *et al.*, 2005). Outros aspectos usados para determinar a competência do oócito para o desenvolvimento incluem avaliações

morfológicas dos embriões PIV como o número total de blastômeros ou a proporção entre o número de células da massa celular interna (MCI) e do trofotoderma (TE). Contudo, o teste fundamental da qualidade de um blastocisto é a sua capacidade de estabelecer a gestação e gerar um animal saudável (DURANTHON; RENARD, 2001). Na maioria dos estudos, por diversas razões como logística, economia e tempo despendido na pesquisa, métodos alternativos são utilizados para avaliar a qualidade embrionária. A cinética do desenvolvimento embrionário, expressão gênica e apoptose servem como critérios funcionais para inferir sobre a qualidade de embriões produzidos *in vitro* (MACKAREVICH; MARKKULA, 2002).

Na biotécnica de produção *in vitro* de embriões (PIV), evidências demonstram que a competência dos oócitos e as condições de cultivo *in vitro* (CIV) pós fecundação comprometem a produção e qualidade dos embriões que atingem o estágio de blastocistos (RIZOS *et al.*, 2003). Por apresentarem baixa qualidade ao término do CIV estes embriões respondem por menores taxas de gestação e nascimento quando comparados aos embriões produzidos *in vivo* (FARIN *et al.*, 2001). Por vezes, até mesmo a saúde e o desenvolvimento dos animais pós-natal podem ser comprometidos por condições impostas pelo ambiente de cultivo (NIEMANN & WRENZYCKI, 2000). O aspecto morfológico dos embriões ao término do CIV fornece bom indicativo da sua capacidade de estabelecimento de gestação, no entanto, este critério de avaliação ainda é bastante subjetivo, não sendo possível prever com exatidão o sucesso da transferência dos embriões.

Apesar de ainda não existir um consenso com relação a 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* (VIREQUE *et al.*, 2009; CORRÊA *et al.*, 2008). 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, Bcl-2) e estresse (Hsp 70) celular, comunicação através de *gap junctions* (Cx31 e Cx43), diferenciação celular (LIF), reconhecimento materno (IFN-tau), entre

outros (RIZOS *et al.*, 2003; DODE *et al.*, 2001; NIEMANN & WRENZYCKI, 2000).

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, (2002) observaram que a expressão da proteína Bax foi muito maior que a expressão de Bcl-2 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.

Outro gene comumente avaliado e relacionado à qualidade de oócitos e embriões é o Hsp 70. Este há muito vem sendo utilizado como avaliação de resposta ao estresse de embriões bovinos produzidos *in vitro* na fase de pré-implantação (NIEMANN & WRENZYCKI, 2000). A proteína Hsp 70 que protege a célula contra os efeitos do estresse foi muito bem caracterizada em oócitos e embriões.

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* (LONERGAN *et al.*, 2006). Dessa forma, a quantificação da abundância relativa de transcritos, comumente avaliada por PCR, 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.

3.4.1 Expressão gênica

Sabe-se que antes da ativação do genoma embrionário o desenvolvimento é comandado por RNAs e proteínas estocadas no oócito

durante o período de crescimento e maturação. Tais genes são transcritos de forma estágio e tempo dependente. Dos genes transcritos, muitos estão envolvidos com regulação da transcrição e tradução, modificação pós-tradução de proteínas, regulação do ciclo celular, entre outros (WRENZYCKI *et al*, 2007). Para determinar a base molecular da maturação do oócito, faz-se necessária a identificação de genes expressos diferencialmente durante o processo. Vários estudos nesse sentido vêm sendo feitos baseados em diversas técnicas de biologia molecular (CUI e KIM, 2007). A análise seriada de expressão gênica (SAGE), por exemplo, foi utilizada para detectar os genes necessários à retomada da meiose dependente de FSH e de transcrição (RODRIGUEZ *et al*, 2007). Já Fair e colaboradores (2007), compararam a expressão diferencial entre oócitos bovinos imaturos e maturados *in vitro* por microarranjo. Independentemente da metodologia utilizada, a biologia molecular se presta como uma importante ferramenta para desvendar os genes envolvidos no controle da maturação do oócito.

Avaliações dos padrões de expressão gênica em roedores e ruminantes envolvem a análise comparativa de transcritos específicos em oócitos e embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, e entre oócitos/embriões produzidos em diferentes sistemas de maturação e cultura *in vitro* (RUSSEL *et al.*, 2006). Tem sido mostrado que a maturação *in vitro* pode alterar a abundância relativa de transcritos em oócitos bovinos (LONERGAN *et al.*, 2003b; HUMBLOT *et al.*, 2005).

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 (MEMILI; FIRST, 1999; MEIRELLES *et al.*, 2004). 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. Estas alterações são, provavelmente, causadas por modificações epigenéticas, como a metilação do DNA e modificações nas histonas (WRENZYCKI *et al.*, 2007). Alguns estudos demonstram que genes induzidos pelo estresse como o SOX, MnSOD, Bax, HSP-70 e G6PD 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* (GUTIERREZ-ADAN *et al.*, 2004). 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-ótimas, compensadas com o ajuste, pelo embrião, do seu programa de desenvolvimento (NIEMANN; WRENZYCKI, 2000).

O Bax, em 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 (RIZOS *et al.*, 2002; LONERGAN, 2006). 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* (RIZOS *et al.*, 2002a) e não da maturação *in vitro*. Dados sobre a influência da MIV na expressão do gene Bax em embriões bovinos são escassos. WARZYCH *et al.*, (2007) 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 e Rejamahendran (2002) reportam expressão do Bax em oócitos e embriões de

diferentes qualidades e maior freqüência de transcritos deste gene em oócitos desnudos.

3.5 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 (KERR *et al.*, 1972; WYLLIE, 1980). 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 freqüência principalmente nas células embrionárias.

Nas espécies de mamíferos, as perdas embrionárias podem ocorrer em todas as fases da gestação (DUNNE *et al.*, 2000). A incidência de perda embrionária em novilhas inseminadas artificialmente pode chegar a 22% no 14 dia de gestação, sem perdas adicionais até o 30 dia. No intervalo correspondente ao 30 dia 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 (DUNNE *et al.*, 2000).

Embora se saiba muito pouco sobre os possíveis sinais de morte celular seja executado e controlado, todas as vias apoptóticas terminam com a ativação das caspases (COHEN, 1997; SALVESEN & DIXIT, 1997). A presença de blastômeros apoptóticos em embriões de mamíferos em fase de pré implantação tem sido descrita em varias espécies, incluindo camundongo, ovelha, cavalo, vaca, porco e humanos (SALVESEN; DIXIT, 1997).

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 (WYLLIE, 1980). Em camundongos, a

apoptose esta 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 (BYRNE *et al.*, 2002). 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 (MEIRELLES *et al.*, 2004).

Uma das alterações mais frequentes encontradas durante o desenvolvimento pós-clivagem do embrião esta relacionada com a fragmentação nuclear atribuída ao processo de morte celular programada, com maior acometimento das células da MCI. Acredita-se que o objetivo deste mecanismo seja eliminar algumas destas células que impeçam o potencial de desenvolvimento do trofotoderma (TE) 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 (PAULA-LOPES; HANSEN, 2003). 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 (BYRNE *et al.*, 2002) e a presença destas mudanças celulares tem sido consideradas evidencia de atividade apoptótica. Tem sido observado que embriões produzidos *in vitro* tem maior índice de fragmentação de blastômeros que embriões produzidos *in vivo* (SIRISATHIEN; BRACKETT, 2003). 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 (2003) 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 (BYRNE *et al.*, 2002). Outros autores afirmam que o microambiente durante a MIV não afeta significativamente a fragmentação nuclear nos blastocistos produzidos *in vitro* (WATSON *et al.*, 2000). No entanto,

CUI *et al.*, (2007) 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. 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.

3.6 Sistemas de maturação *in vitro*

A maturação *in vitro* é uma ferramenta importante na reprodução assistida humana e tornou-se uma técnica comercial na produção de embriões bovinos. Para isso um grande número de formulações de meios de cultura, sob diferentes condições e protocolos, é utilizado rotineiramente.

3.6.1 Meio TCM-199

O meio de cultivo tecidual 199 (TCM-199) é considerado o meio padrão para a maturação *in vitro* de oócitos e é utilizado na maioria dos protocolos de MIV com ou sem suplementação de soro, modificado conforme a rotina do laboratório (KESKINTEPE; BRACKETT, 1995). Geralmente, são adicionados, L-glutamina, bicarbonato de sódio, HEPES, piruvato de sódio e hormônios. Vários estudos demonstram que o TCM-199 suplementado com fatores de crescimento e/ou hormônio melhora a maturação citoplasmática quando comparado com outros meios de cultura (LONERGAN *et al.*, 1997). No momento, por ser um meio complexo não é possível relacionar especificamente os componentes que são responsáveis pelos diferentes resultados obtidos. Pesquisadores reportam que o TCM-199 apresenta efeito na maturação que

resulta em uma maior divisão celular e conseqüentemente em melhor desenvolvimento embrionário.

Outros estudos estão focados na elaboração de meios de cultura para a MIV em sistema livre de soro (GARDNER, 1994; KESKINTEPE; BRACKETT, 1996; ALI; SIRARD, 2002). Estes estudos têm obtido sucesso no desenvolvimento de embriões bovinos até o estágio de blastocisto, usando o meio TCM-199 como base para a MIV. Contudo, ainda não se sabe como a composição básica do meio interfere na maturação oocitária.

3.6.2 Meio Alfa-MEM (α -MEM)

O meio MEM (Minimum Essential Medium) foi desenvolvido para o cultivo de células somáticas, quando o meio Eagle – BME (Basal Media Eagle) tornou-se insuficiente para suportar o crescimento em cultura de células HeLa (linhagem imortalizada de células derivadas de carcinoma cervical de uma paciente Henrietta Lacks, utilizada no cultivo de vírus). Foi verificado que com a adição de certos suplementos o BME se tornaria adequado para cultivo de uma variedade de células. O MEM incorporou estas modificações em sua formulação, com maior concentração de aminoácidos, o que aumentou a gama de aplicações deste meio. A modificação alfa (α -MEM) consistiu na adição de aminoácidos não essenciais, piruvato de sódio, ácido lipóico, ácido ascórbico, biotina e vitamina B12.

O meio α -MEM foi testado pela primeira vez para a MIV de oócitos bovinos por Rose e Bavister (1992). Os autores compararam 7 meios de cultura diferentes utilizando o TCM199 como controle e obtiveram resultados semelhantes ao controle. Porém, mesmo com os resultados obtidos neste estudo seu uso não foi difundido para a maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

O cultivo de folículos ovarianos humanos em meio α -MEM resultou em aumento significativo na iniciação e crescimento dos folículos durante os primeiros dez dias de cultura. WU *et al.* (2007) obtiveram aumento no índice de embriões produzidos e nas taxas de gestação clínica de embriões murinos cultivados em meio α -MEM. Outros dois estudos demonstraram influencia positiva do meio α -MEM no desenvolvimento de embriões murinos e humanos,

com aumento nos índices de gestação e redução nas taxas de aborto espontâneo (OLAR; POTTS, 1993).

3.6.3 Suplementos: soro, proteínas, hormônios e macromoléculas sintéticas

Diversos grupos de reagentes são necessários no meio de maturação *in vitro* do oócito, etapa da cultura na qual ocorre uma marcada reprogramação dos eventos nucleares e citoplasmáticos do gameta.

A suplementação protéica tem mostrado ser um fator crucial na eficiência dos sistemas de cultura *in vitro*. O soro e albumina sérica bovina (BSA) são as fontes protéicas mais comumente utilizadas como suplemento nos meios de cultura de oócito e embriões de mamíferos. Entretanto, estes compostos podem ser contaminados com diversas moléculas definidas e indefinidas, tais como esteróides, colesterol e peptídeos, as quais o oócito e o embrião não são expostos *in vivo* (GARDNER, 1994). Segundo alguns autores, as preparações comerciais de BSA têm apresentado variações significativas entre lotes, as quais podem afetar positiva ou negativamente os resultados *in vitro*. Alguns estudos também demonstram um efeito bifásico do soro no desenvolvimento embrionário, com efeito inibitório nos primeiros estágios de clivagem e efeito estimulatório nos estágios mais tardios da embriogênese, no desenvolvimento de mórulas até o estágio de blastocisto, acelerando o processo de blastulação (WANG *et al.*, 1997), aumentando o número de blastômeros e estimulando a eclosão (PINYOPUMMINTR; BAVISTER, 1991). O soro adicionado ao meio de MIV freqüentemente permite uma melhora na qualidade do oócito, na taxa de fertilização e no desenvolvimento embrionário. No entanto, a reprodutibilidade dos resultados, quando se utiliza o soro, pode variar de acordo com a partida e, por se tratar de produto biológico é preciso considerar o risco de contaminação por agentes bacterianos e virais (PINYOPUMMINTR; BAVISTER, 199; SAGIRKAYA *et al.*, 2007). Adicionalmente, a suplementação com soro pode induzir alterações na transcrição de genes relacionados com o desenvolvimento, independente do estágio da cultura (maturação *in vitro*, fertilização ou cultivo pós-fertilização) (WRENZYCKI *et al.*, 2007; RUSSELL *et al.*, 2006), e afetar os processos

celulares de apoptose (WARZYCH *et al.*, 2007) e a esteroidogênese das células do *cumulus* (GUTIERREZ *et al.*, 1997).

A suplementação hormonal, incluindo gonadotrofinas, fatores de crescimento e esteróides, na MIV, embora rotineiramente empregada, é controversa, pois há grande variação entre os protocolos experimentais (ALI *et al.*, 2005). É usual a utilização do FSH, do LH ou ainda a combinação das duas gonadotrofinas. No entanto, há vários questionamentos sobre a real necessidade desses hormônios e as concentrações a serem utilizadas. Estudos demonstram que o uso de preparações altamente purificadas de LH no meio de MIV aumenta a qualidade oocitária e o índice de produção *in vitro* de embriões. Os mecanismos pelos quais o LH influencia a maturação do oócito bovino incluem mudanças na distribuição do cálcio no citoplasma, aumento da glicólise e da oxidação mitocondrial nas CC, além de aumentar o metabolismo da glutatona no oócito. O FSH é utilizado com frequência nos sistemas de MIV de oócitos bovinos e estudos recentes sugerem que sua presença no meio de cultura é necessária apenas nas primeiras horas de MIV (ALI; SIRARD, 2005). O FSH estimula a secreção de E2 pelas CC, a síntese e secreção de ácido hialurônico e estimula a plasmina (RICHARDS *et al.*, 1996a), regulando a expansão do *cumulus* durante a MIV.

A função dos esteróides na MIV do oócito ainda não está estabelecida. A suplementação do meio de maturação com estradiol, geralmente em doses farmacológicas, é controversa e há grande variação nos resultados obtidos em diferentes estudos (SIRARD, 1998).

A adição de fatores de crescimento aos sistemas de MIV tem mostrado ser vantajosa. O IGF-1, sozinho ou em associação com a insulina, estimula a maturação oocitária e a esteroidogênese das CC (GUTIERREZ *et al.*, 1997). Como este peptídeo apresenta ação gonadotrófica e age em sinergismo com o FSH pra estimular a atividade ovariana, sua inclusão em meios de MIV livres de soro pode ser importante. Contudo, ainda não há um consenso acerca da melhor e mais adequada suplementação com hormônios e fatores de crescimento.

Macromoléculas sintéticas, como o álcool polivinílico (PVA) [-CH₂CHOH-] e a polivinilpirrolidona (PVP) (C₆H₉NO) são polímeros hidrofílicos, com peso molecular entre 30.000 a 70.000, utilizados no meio de cultura celular para a

estabilização da pressão osmótica, como surfactantes e agentes quelantes de metais pesados (HIRAO *et al.*, 2004). Evidências demonstram que o PVA e o PVP-40 podem substituir proteínas (ALI; SIRARD, 2002) e o soro na maturação *in vitro* de oócitos bovinos sem comprometer o desenvolvimento subsequente (WATSON *et al.*, 2000; ALI; SIRARD, 2002). Estudos prévios demonstram que o PVP não é somente um substituto adequado para o soro, mas é benéfico para a MIV e esta associada a aumento da qualidade do embrião (SIRARD *et al.*, 2007). Embora existam poucos relatos sobre as propriedades físico-químicas destes polímeros, sabe-se que os mesmos podem exercer influência nas propriedades de adesão das células, adsorção de proteínas e difusão de fatores parácrinos e autócrinos no meio de cultura. O PVP parece diferir do PVA em algumas propriedades como peso molecular, solubilidade e pH. De fato, Wang e colaboradores (2004) citam que diferentes polímeros podem apresentar diferentes propriedades, incluindo peso molecular, tipo e densidade de cargas, estrutura e seqüência, e flexibilidade conformacional da molécula, as quais estão associadas a diferenças na citotoxicidade.

4. A razão de ser deste trabalho: o estado da técnica

A produção *in vitro* de embrião (PIV) é uma biotecnologia reprodutiva de grande potencial de expansão quando se trata do melhoramento genético de animais de interesse comercial, como bovinos, no resgate de animais silvestre em extinção e em clínicas reprodutivas humana. O uso de PIV por companhias comerciais que produzem embriões, em clínicas de reprodução humana e no manejo da fauna, tem aumentado exponencialmente nos últimos anos.

De maneira geral, a PIV envolve a maturação do oócito oriundo de folículos imaturos (MIV), a fertilização *in vitro* (FIV) e finalmente a produção de embriões *in vitro* (PIV). A MIV é um dos gargalos da PIV e envolve alterações em aspectos morfológicos e moleculares que se não ocorrerem, bloqueiam a eficiência da PIV. Essas diferenças são provavelmente induzidas por muitos fatores, tais como, a raça do animal, a qualidade do oócito, o meio folicular, a fertilização e o meio de cultura do embrião (LONERGAN, *et al.*, 2006).

In vivo a ocorrência da maturação oocitária é caracterizada pelo alto potencial de desenvolvimento da célula pós-fertilização. Contudo, em condições laboratoriais ou à campo (*in vitro* ou por meio de técnicas de superovulação) a qualidade do oócito cai drasticamente e conseqüentemente, também a produção de embriões.

Na produção de embriões *in vivo*, aproximadamente 81% dos oócitos ovulados vão chegar a embrião até o 13º dia da fecundação, quando avaliados pela taxa de concepção. Enquanto na produção de embriões *in vitro* a taxa de desenvolvimento embrionário, até o sétimo dia da fecundação é no máximo de 30 a 40%. Existem indicações que essa diferença na taxa de produção de embrião é influenciada pela diferença na competência de desenvolvimento entre os oócitos. Na MIV trabalha-se com uma população heterogênea de oócitos, uma vez que esses são obtidos de folículos imaturos. Portanto, a população inicial de oócitos, encontra-se em estágios diferente de maturação, o que leva a diferenças importantes na MIV e conseqüentemente nos resultados da PIV.

Uma das principais causas da diminuição do desempenho de oócitos maturados *in vitro* é o fato de serem retirados de folículos imaturos, e por isto, ainda não terem passado pelo processo de aquisição de competência que ocorre no fim do desenvolvimento folicular, logo após o pico de FSH e LH (BREVINI-GANDOLFI, 2001). Por este motivo, torna-se necessário o melhoramento da técnica de MIV, para permitir ao oócito se desenvolver *in vitro* de forma mimética a situação *in vivo*. O desenvolvimento de metodologias que visam sincronizar a maturação do núcleo e do citoplasma é bastante desejável.

No presente trabalho foi considerado que um sistema para este tipo de cultura se torna mais válido a medida que se aproxima cada vez mais do evento fisiológico e à medida em que se torna reprodutível. Estas são as duas premissas mais importantes para aceitar os resultados de um sistema *in vitro*. Dessa forma, os meios de cultura definidos propostos no presente trabalho, foram baseados nestes dois paradigmas. Essa foi a base para a estruturação do pensamento lógico fundamental desta pesquisa, o qual se refere à construção de um folículo artificial que mimetiza o folículo pré-ovulatório, utilizando meio definido, visando o retardo da maturação nuclear e a

aceleração da maturação citoplasmática, levando a sincronia tempo-dependente da maturação núcleo-citoplasmática. O objetivo do presente trabalho foi obter meios de cultura otimizados para a produção de oócitos maturados e o controle do processo de maturação (meios de cultura definidos) e avaliar nestes meios o efeito do FSH.

Maturação oocitária *in vivo*:

In vivo a maturação oocitária se dá gradualmente à medida que o estradiol é secretado e concentrações elevadas de FSH e LH, induzam gradativamente com o tempo, a maturação sincronizada do núcleo e citoplasma, conforme abordado na Figura 1.a e 1.b. Nesta figura são abordados os principais eventos para a maturação oocitária:

CROSS TALK no folículo em desenvolvimento

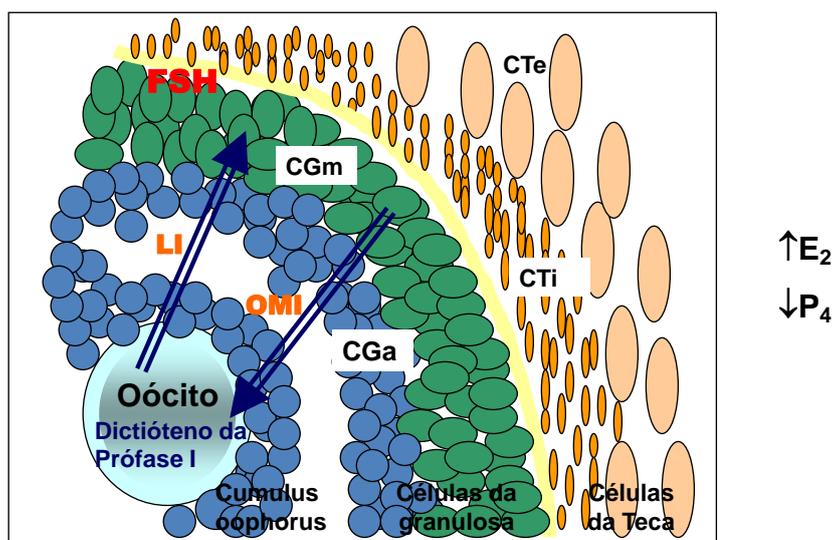


Figura 1.a: Folículo em desenvolvimento *in vivo*: Comunicação das células da teca externa e interna (CTe, CTi) com as células da granulosa mural e antral (CGm, CGa) enviando para o oócito o fator inibidor da maturação (OMI) e, respectivamente, o oócito envia o inibidor da luteinização (LI). O FSH (hormônio folículo estimulante) nesta fase atua sobre as CT e CG. Os níveis de estradiol (E2) estão elevados e os de progesterona (P4) baixos. Ocorre sincronia entre a maturação nuclear e citoplasmática.

CROSS TALK PRÓXIMO A OVULAÇÃO

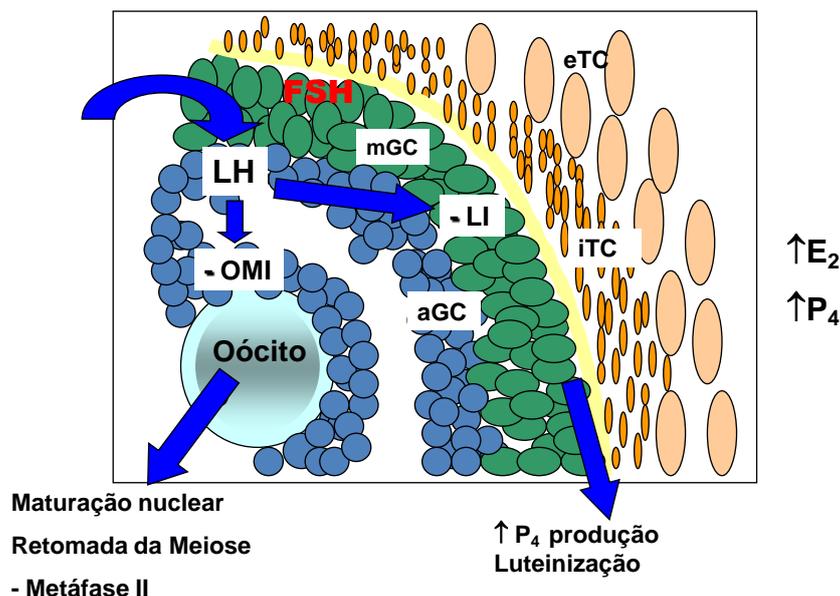


Figura 1.b: Cross talk no folículo próximo a ovulação in vivo: Comunicação das células da teca externa e interna (CTe, CTi) com as células da granulosa mural e antral (CGm, CGa). O hormônio luteinizante (LH) se eleva e inibe o inibidor da luteinização (LI) e o fator inibidor da maturação (OMI) para as células se luteinizarem, indicando que o oócito está preparado para ovular e ser fertilizado. O FSH (hormônio folículo estimulante) atuando sobre as CT e CG. Níveis elevados de estradiol (E₂) e progesterona (P₄). Evento que ocorre durante a Metáfase II, momento em que o oócito está próximo a ovular.

1- um folículo ovariano é composto por células somáticas da teca (TC), por células somáticas da granulosa (CG) e por um elemento germinativo que é o oócito (OO);

2- As CG são antrais, murais e células do *cumulus* (CC), estas últimas juntamente com o oócito formam o complexo *cumulus oophorus* (COC);

3- Quando o folículo cresce, o oócito também cresce e vai gradativamente maturando-se, neste momento as CG produzem cada vez mais estradiol;

4- Este estradiol aumenta a secreção pulsátil de FSH e LH, que continua maturando o oócito, tanto morfológica e bioquímica, como molecularmente;

5- Próximo da ovulação, o estradiol em concentrações máximas, promove uma secreção máxima de FSH e LH, com sua maior frequência de secreção e o oócito finaliza sua maturação;

6- A progesterona é secretada após o amadurecimento do oócito e após a ovulação pelas células da granulosa luteinizadas pela ação do LH.

As células foliculares possuem um importante papel fisiológico na formação dos folículos ovarianos, bem como na maturação do oócito. Antes de acontecer a ovulação, as células da granulosa (CG) dos folículos pré-antrais e pequenos folículos antrais sofrem um intenso período de proliferação e diferenciação celular e subsequente mudança na secreção hormonal.

No entanto, as descobertas nesta área somente devem ser consideradas relevantes se as características morfológicas, bioquímicas e moleculares das células cultivadas forem mantidas durante a cultura.

É evidente que para se fazer inferências sobre a fisiologia do processo é essencial que as células cultivadas apresentem as mesmas características e secretem os mesmos hormônios que as células *in vivo*.

Diante dessas constatações, observa-se então a necessidade do desenvolvimento de um sistema de cultura que seja capaz de manter a atividade estrogênica, uma vez que num folículo em desenvolvimento a relação estradiol/progesterona é alta.

Montezor e colaboradores descreveram pela primeira vez um sistema de cultura de células da granulosa totalmente definido, no qual o BSA é substituído por Álcool Polivinílico (PVA), um doador de macromoléculas inerte. Neste sistema, a produção de estradiol foi elevada até 48 horas de cultura e se manteve até 144 horas. Além da morfologia destas células terem sido preservada. Neste caso, foi desenvolvido um sistema estritamente definido que permite o estudo dos fatores fisiológicos que regulam a proliferação e diferenciação celular. O diferencial para este trabalho, é que ele utiliza o meio definido contendo PVA para a maturação de oócitos de mamíferos, não

estando relacionado a cultura de células de granulosa, conforme os primeiros estudos na presença desse polímero, citados acima.

As CG cultivadas sob tais condições mostraram *in vitro* atividade funcional de CG da fase folicular do ciclo estral, mantendo a sinalização oócito – CG que inclui a secreção de diferentes fatores, incluindo o OMI (inibidor da maturação do oócito). Conclui-se, então, que o desenvolvimento de um sistema de cultura definido de CG bovinas produtoras de estradiol mimetiza um folículo em desenvolvimento e/ou maturação, o que é um forte indicativo para sua utilização na maturação oocitária (VIREQUE, et al., 2003).

5. MATERIAL E MÉTODO

5.1 Delineamento experimental

Experimento 1: Produção *in vitro* de embrião oriundos da fertilização de oócitos bovinos maturados em meio α -MEMC+PVA+HS, indutores de inibição da maturação nuclear oocitária (OLIVEIRA E SILVA, I; 2008).

Os COCs foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes tratamentos:

- 1) TCM-199 + SFB (grupo controle)
- 2) TCM-199 + SFB + HS
- 3) α -MEMC + PVA + HS

Foi analisada a maturação oocitária nuclear e citoplasmática. Como resultado, a produção de embrião não foi analisada, pois os COCs morreram.

Experimento 2: Esquema temporal de maturação *in vitro* utilizando pré-maturação-bloqueio (24 horas em meio α -MEMC+PVA) e reversão (24 horas em meio controle TCM-199) 48 horas de MIV: Efeito do FSH adicionado ao meio de maturação α -MEMC+PVA, indutor da inibição da maturação nuclear oocitária, sobre a produção *in vitro* de embriões oriundos da fertilização destes oócitos bovinos.

Os COCs foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes tratamentos:

- 1) TCM-199 + SFB (grupo controle)
- 2) α -MEM C suplementado com PVA
- 3) α -MEM C suplementado com PVA e FSH 1 ng

4) α -MEM C suplementado com PVA e FSH 10 ng

O grupo alfa MEMC+PVA foi submetido ao sistema de pré-maturação: Inibição da maturação nuclear de COCs pelo cultivo de oócitos em α -MEMC+PVA (24 h) acrescido ou não de FSH e em meio controle TCM-199 – reversão (24 h suplementares).

Experimento 3 : Sistema direto de maturação *in vitro* (24 horas): Efeito do FSH adicionado ao meio de maturação α -MEMC+PVA, indutor da inibição da maturação nuclear oocitária, sobre a produção *in vitro* de embriões oriundos da fertilização destes oócitos bovinos maturados *in vitro*.

Os COCs foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes tratamentos:

- 1) TCM-199 + SFB (grupo controle)
- 2) α -MEM C suplementado com PVA
- 3) α -MEM C suplementado com PVA e FSH 1 ng
- 4) α -MEM C suplementado com PVA e FSH 10 ng

A maturação oocitária *in vitro* foi realizada em todos os grupos durante 24h, quando foi feita a fertilização *in vitro*. A taxa de clivagem foi avaliada 72h após a fertilização. A produção de blastocistos foi avaliada após 168 h de cultivo.

Experimento 4: Efeito do FSH adicionado ao meio de maturação α -MEMB+PVA, indutor da inibição da maturação nuclear oocitária, sobre a produção *in vitro* de embriões oriundos da fertilização destes oócitos bovinos.

Aproximadamente 20 a 25 COCs após selecionados do pool foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes tratamentos:

- 1) TCM-199 + SFB (grupo controle)
- 2) α -MEM B suplementado com PVA
- 3) α -MEM B suplementado com PVA e FSH 1 ng
- 4) α -MEM B suplementado com PVA e FSH 10 ng

Experimento 5: Estudo da expressão dos genes de Bax, Bcl-2 e Cx-43 em blastocistos, produzidos após a fertilização de oócitos maturados em meio controle (TCM-199) e o meio α -MEMB+PVA associado ou não ao FSH (1ng ou 10 ng/mL). Resultados preliminares.

Os embriões foram produzidos como no experimento 4 e após foram submetidos a análise da expressão dos RNAm pelo RT-PCR.

5.2 Coleta dos ovários e seleção dos oócitos

Ovários bovinos obtidos em frigorífico foram mantidos à temperatura inicial de 36°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. No laboratório, os folículos entre 2 e 8 mm de diâmetro foram aspirados com auxílio de uma seringa 10mL e agulha 18G, 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 oócitos foram selecionados e classificados sob estereomicroscópio de acordo com os critérios descritos por De LOSS e colaboradores (1989).

5.3 Preparo das hemi-seções foliculares

Folículos entre 3-5 mm, com formato esférico e parede translúcida foram dissecados com auxílio de tesouras e bisturi, em placas de petri e ambiente estéril e foram mantidos em PBS aquecido até serem seccionados para serem colocados em cultivo. As hemi-seções foram lavadas uma vez em PBS aquecido a 38° C e uma vez no meio de cultivo, sendo incubadas 10 hemisseções /1000µl de meio em estufa com 95% de umidade, 5% de CO₂, a 38,5° C, por 24 horas.

Foram utilizados dois meios de cultivo, para comparação. Um meio quimicamente definido, α -MEMC+PVA, por permitir a padronização destes procedimentos, e o meio de cultura de tecidos, TCM199+SFB como controle, por se tratar do meio de maturação tradicionalmente utilizado.

5.4 Maturação dos oócitos

Os complexos *cumulus*-oócitos (CCO), morfológicamente classificados quanto à qualidade como de grau I, II e III (excelente, bom e regular, respectivamente) foram lavados TCM-Hepes acrescido de piruvato de sódio e

10% de SBF e amicacina. Imediatamente, vinte a vinte e cinco CCOs foram transferidos para placas de petri contendo gotas de 90 μ L de TCM-199 + FSH para grupo dos meios controles.

Para a maturação *in vitro* dos meios testes, foram utilizadas placas de NUNC 4 poços, acrescidas de 400 μ L de cada meio por gota. Os CCOs foram mantidos por 24 horas, em estufa de cultivo com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada, à temperatura de 38.5°C.

No experimento 2 foram utilizados 1000 microlitros de meio sendo cultivados 20-25 COCs com 10 HS. Após 24 horas de cultivo em estufa com 95% de umidade, 5% CO₂. Nos experimentos restantes foram utilizados 20 a 25 oócitos por meios de cultivo.

5.5 Fecundação *in vitro*

Após a maturação, os oócitos foram transferidos para placa contendo gotas de 90 μ L placas 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 38°C. O gradiente de Percoll juntamente com o sêmen foram submetidos à centrifugação de 4750 rpm por 30 minutos. A concentração final foi ajustada para 1 x 10⁶ espermatozóides/ mL de meio Fert-Talp. Os oócitos/ espermatozóides foram incubados a 38,5°C por 20-22 horas em estufa de cultivo nas mesmas condições da maturação *in vitro*.

5.6 Cultivo *in vitro*

As células do *Cumulus oophorus* foram removidas por movimentação de agitação mecânica por pipeta de 10 μ L. Os supostos zigotos foram lavados em gotas de meio SOF. Os zigotos foram cultivados por 9 dias sob óleo mineral em estufa 5% de CO₂, 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) e a taxa de eclosão (BE) no oitavo dia (D8) de cultivo.

5.7 Determinação da expressão do RNAm dos genes Bax, Bcl-2 e Conexina 43.

Foram usados materiais, vidrarias e reagentes RNase-free. A extração do RNAm total foi feita de blastocistos. O RNA total será quantificado com o uso do diluente *GeneQuant pro UV/Vis Spectrophotometer RNA/DNA calculator* e após a quantificação será feita a transcrição reversa para obtenção de fitas simples de cDNA.

A extração do RNAm foi preparada a partir de grupos de pelo menos 20 embriões com idade de oito dias (estágio de blastocisto) como amostra de cada grupo de meios, sendo transportadas em nitrogênio líquido para o Laboratório de Biologia Molecular da UnB onde foram submetidas à extração de RNA total com o kit *TRIZOL[®] reagent* seguindo as recomendações do fabricante. Para as etapas de centrifugação foi utilizada uma centrífuga *Eppendorf 5804R* a 1200-7500g e a 2-8°C por 5-10 min. O RNA precipitado foi redissolvido em 3 microlitros de água RNase free e analisado quanto a qualidade da preparação no espectrofotômetro *GeneQuant pro UV/Vis RNA/DNA Calculator – Amersham Pharmacia Biotech*.

5.7.1 Síntese de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA, foi realizada com o kit *Super Script[™] III Reverse Transcriptase*. Todos os reagentes foram da *Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA*. Foram aplicados como template 2 microlitros de RNA total para cada um dos grupos de estudo. A reação foi realizada em um termociclador *MJ Research, Inc.*, onde o primeiro ciclo ocorreu a 50° C durante 60 min e o segundo ciclo a 70° C por 15 min.

5.7.2 Reação de polimerização em cadeia

Os produtos das reações de RT-PCR foram utilizados como template para amplificação dos marcadores moleculares Bax, Bcl2, Conexina- 43 e GAPDH como controle interno, por PCR (*Polymerase chain reaction*). Os

primers para Bax, Bcl2, Conexina- 43 e GAPDH foram desenhados com o auxílio do programa OligoAnalyzer 3.1 (IDT), baseados nas seqüências de DNA depositadas no *GenBank* (Tab. 1). A reação foi realizada em um termociclador *MJ Research, Inc.*, onde o ciclo era iniciado a 95°C (2 min.) seguido de 40 ciclos a 95°C (30 seg.), 56°C (50 seg.) e 72°C (1 min.). Os produtos das reações de PCR foram posteriormente submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, para análise dos amplicons (tabela 1).

Tabela 1. Seqüência, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos dos primers usados no RT-PCR.

Gene	Seqüência	Temperatura de Anelamento (°C)	Tamanho do Fragmento (pb)	Nº de acesso ao GenBank
Cx-43	Reverse: 5'AGAACACATGATCGATGGAC Forward: 5'TCTGGAATGCAAGAGAGG	58 54	285	NM_174068
Bax	Reverse: 5'CCACAGCTGCGATCATCC Forward: 5'GAGCAGATCATGAAGACAGG	58 60	201	NM_173894
Bcl-2	Reverse: 5'CGACATCTCCCGTTGAC Forward: 5'GACTTCTCTCGGCGCTAC	58 58	194	XM_586976

5.8 Oligonucleotídeos Iniciadores (*primers*)

Foram usados os oligonucleotídeos iniciadores que ligam-se a regiões altamente conservadas, desenhados pelo Prof. Dr. Fernando Araripe Torres (Laboratório de Biologia Molecular – UnB) a partir das seqüências obtidas no *GenBank* para a espécie *bos taurus*, sendo as seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores senso (*forward*) e anti-senso (*reverse*) localizadas em diferentes exons (tabela 2).

Tabela 2: Seqüência dos *primers* específicos dos genes Bax,, Bcl-2 e Cx-43 de bovinos (*bos taurus*)

Oligonucleodídeo iniciador	Seqüência	Tamanho do amplicon
Bax	“F”5’-CATTGACCTTCACTACATGGT “R”5’-ACCCTTCAAGTGAGCCCCAG	pb
Bcl-2	“F” 5’CTACAGACATGTGCGCAGCATG “R”5’CATGCGCTCCACAAGCTCTTC	pb
Cx-43	“F”5’-CAATGGCTGGCTTAACCTCTAC “R”5’-TGGATTCAGCAGTGGGATGAAG	pb

5.9 Análise estatística

Cada experimento foi feito em 11 (onze) vezes, sendo agrupados e relatados como número e porcentagem de oócitos maturados que clivaram e atingiram os estágios de desenvolvimento embrionário indicados (blastocistos). A análise dos resultados foi feita através da ANOVA (Análise de Variância) de uma via para verificar diferenças estatísticas e o teste de Bonferroni para determinar diferenças entre os grupos de tratamento. Para determinar se havia diferença na clivagem e desenvolvimento embrionário entre os grupos que sofreram reversão do processo de maturação e dos que não sofreram foi feita ANOVA de 2 vias. O Teste *t* de *Student* foi então realizado para determinar se havia diferenças significativas entre o parâmetro (clivagem e formação do embrião) durante a reversão *versus* não reversão.

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.

6. RESULTADOS

6.1 Experimento 1: Produção *in vitro* de embriões oriundos da fertilização de oócitos bovinos maturados em meio α -MEMC+PVA+HS, indutores da inibição da maturação nuclear oocitária (OLIVEIRA E SILVA, I 2008).

- Pré-maturação:

Foi utilizado os meios de maturação *in vitro* como tratamento de pré-maturação com TCM-199 e α -MEMC + PVA adicionados com hemi-seções foliculares com o intuito de sincronizar a maturação citoplasmática com a maturação nuclear dos oócitos bovinos.

No meio de cultura definido α -MEMC+PVA+HS o citoplasma do oócito estava repleto de substâncias amorfas, as mitocôndrias encontradas se organizaram na periferia do oócito e não possuíam lamelas, o *cumulus* não expandiu, a membrana plasmática não apresentou microvilosidades e possuía um aspecto indefinido, não foram observados espaço perivitelínico, nem grânulos corticais (figura 2).

No meio de cultura TCM-199+SFB+HS os oócitos apresentaram características de maduro, outros com características de degeneração e outros com características de célula plasmolisada. Os oócitos com características de maduro apresentaram *cumulus* expandido, membrana plasmática com microvilosidades eretas, espaço perivitelínico evidente, grânulos corticais isolados e alinhados à membrana, mitocôndrias centrais, organelas

organizadas em associação formando um aspecto de teia com espaços livres de organelas e espaços com aglomerados, grande quantidade de retículo endoplasmático liso foi observada. Os oócitos plasmolisados apresentaram uma grande retração do citoplasma. O *cumulus* sofreu uma pequena expansão, as organelas se distribuíram por todo o citoplasma, formando grupos e deixando espaços livre destas. Um grande número de vesículas também foi observado. A membrana plasmática não apresentou vilosidades e os grânulos corticais se apresentaram alinhados à membrana. (figura 3).

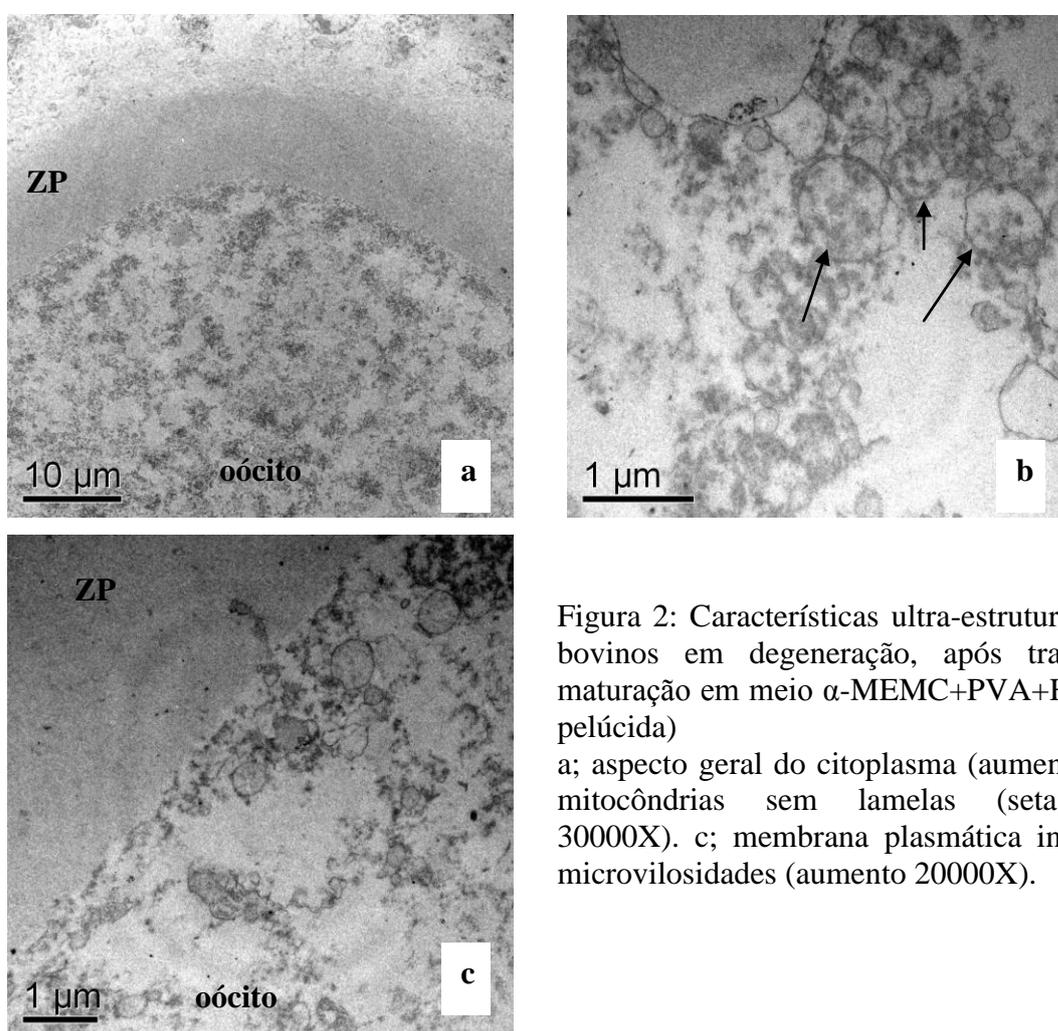


Figura 2: Características ultra-estruturais de oócitos bovinos em degeneração, após tratamento pré-maturação em meio α -MEMC+PVA+HS. (ZP- Zona pelúcida)
a; aspecto geral do citoplasma (aumento 2500X). b; mitocôndrias sem lamelas (setas) (aumento 30000X). c; membrana plasmática indefinida, sem microvilosidades (aumento 20000X).

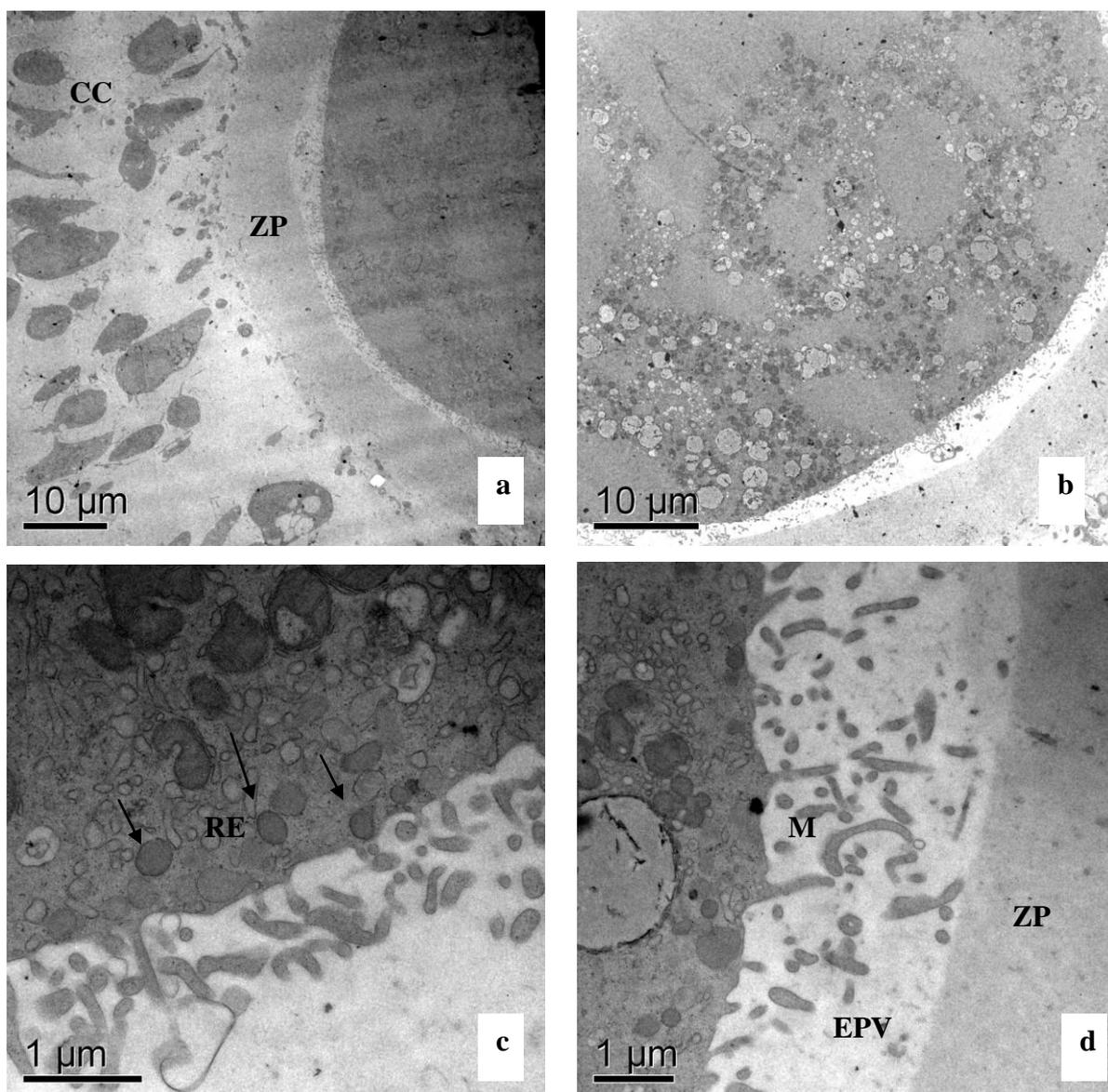


Figura 3: Características ultra-estruturais de oócitos bovinos maduros, após pré-maturação em meio TCM-199 +SFB + HS. (CC- células do *cumulus*; ZP- Zona pelúcida; RE- Retículo endoplasmático; M- Microvilosidades; EPV- espaço perivitelínico) a; células do cumulus expandidas (aumento 2000X). b; aspecto geral do citoplasma (aumento 2500X). c; grânulos corticais isolados (setas) e alinhados à membrana plasmática e grande quantidade de retículo endoplasmático liso (aumento 30000X).d; espaço perivitelínico evidente e microvilosidades eretas (aumento 20000X).

- Reversão:

No meio de cultura definido α -MEMC+PVA+HS as células do *cumulus* não expandiram, a membrana plasmática não apresentou microvilosidades e tinha aspecto indefinido, o citoplasma estava repleto de substâncias amorfas, as mitocôndrias, sem lamelas, se organizaram em grumos na periferia e no interior do oócito, não foi observada a presença de grânulos corticais. (figura 4).

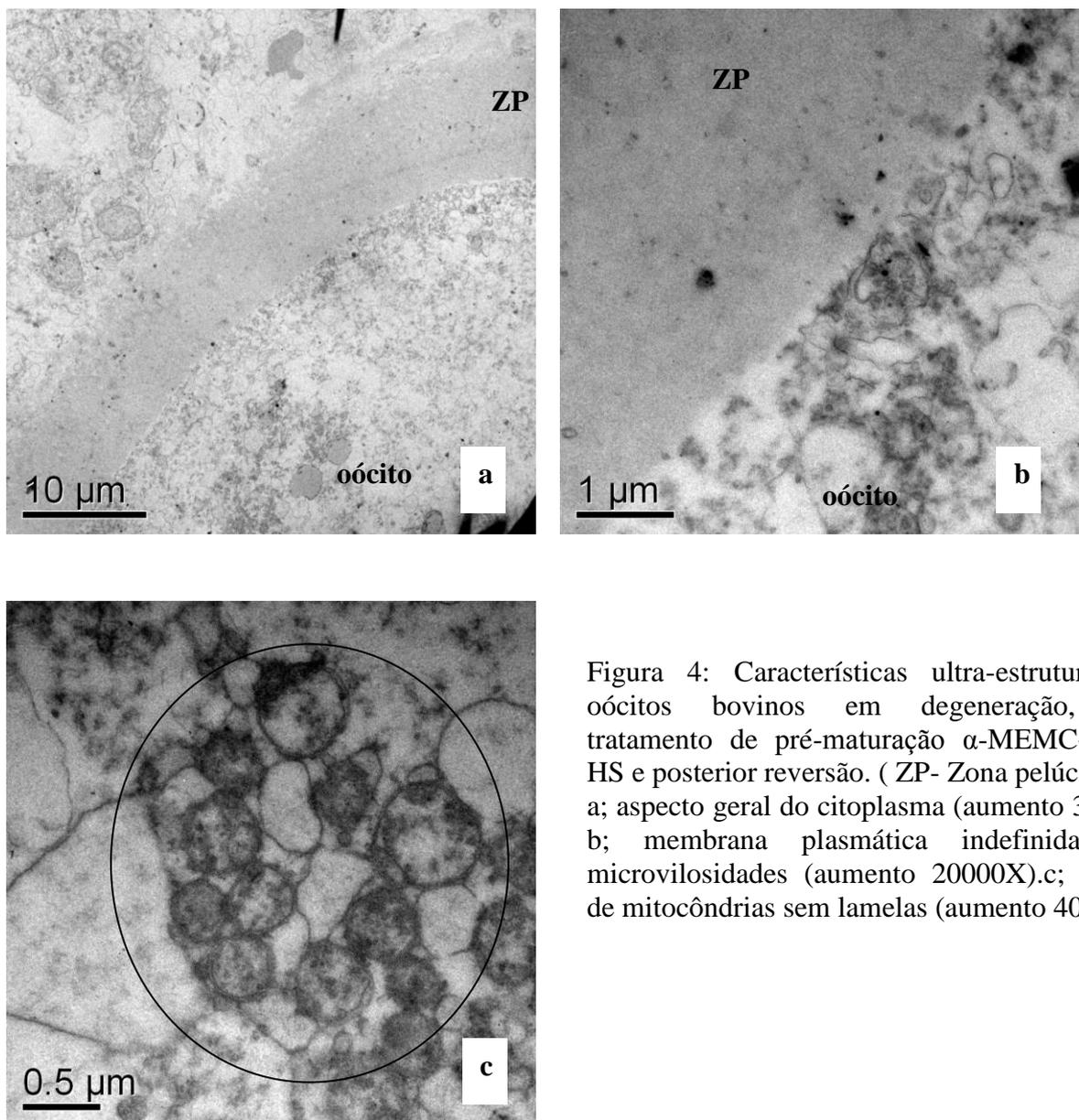


Figura 4: Características ultra-estruturais de oócitos bovinos em degeneração, após tratamento de pré-maturação α -MEMC+PVA+HS e posterior reversão. (ZP- Zona pelúcida) a; aspecto geral do citoplasma (aumento 3000X). b; membrana plasmática indefinida, sem microvilosidades (aumento 20000X).c; grumos de mitocôndrias sem lamelas (aumento 40000X).

No meio de cultura TCM-199+SFB+HS observa-se a maturação completa dos oócitos, como era esperado, podendo ser visto na figura 5. Foi observado que houve uma notável expansão das células do *cumulus*, há a presença de espaço perivitelínico, a membrana plasmática apresenta microvilosidades eretas e grânulos corticais isolados e alinhados a ela, houve a migração das mitocôndrias para uma região mais central, as organelas se organizaram em associações formando um aspecto de teia com espaços livres de organelas, grande quantidade de retículo endoplasmático liso foi encontrada próxima à membrana plasmática.

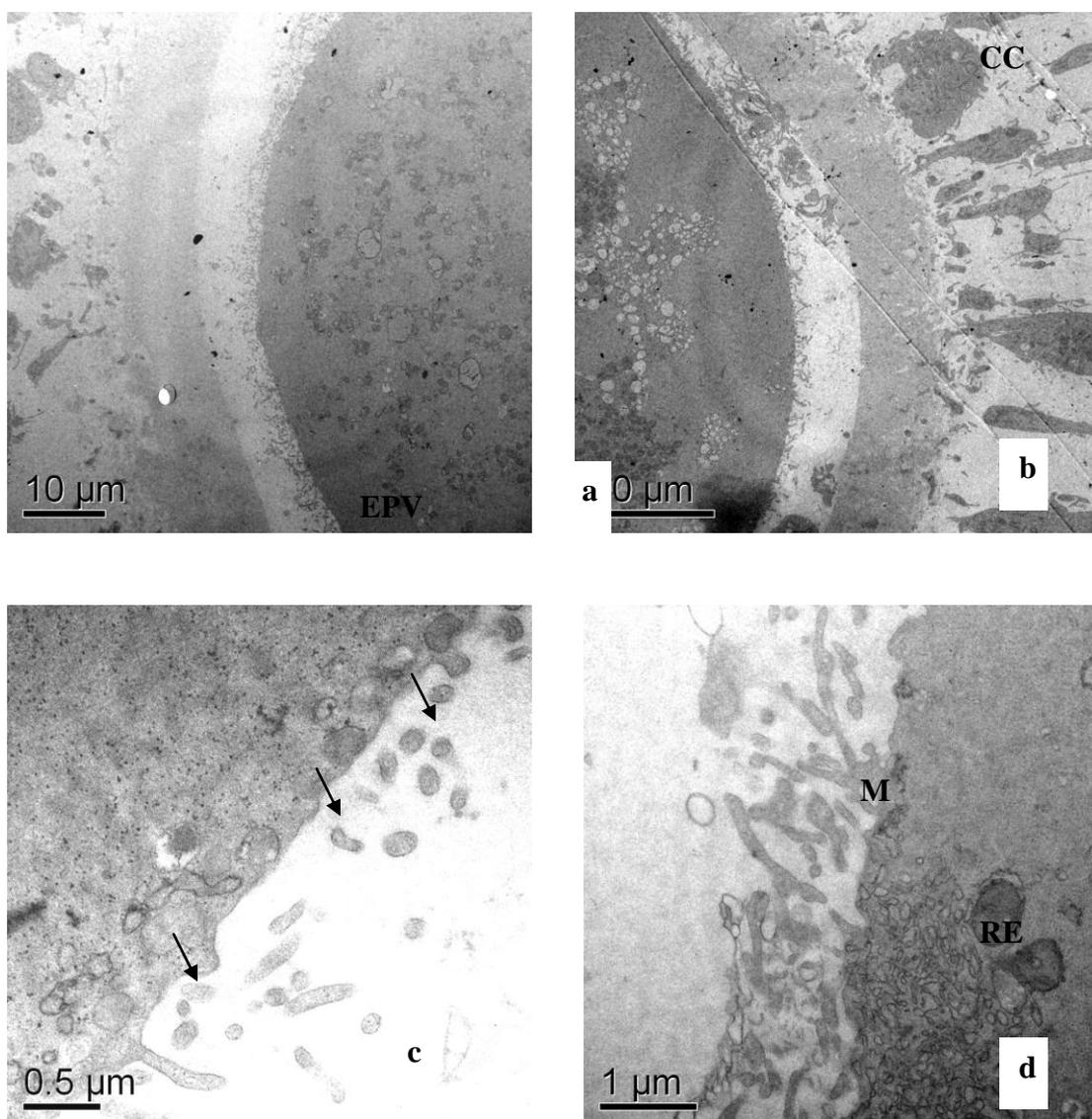


Figura 5: Características ultra-estruturais de oócitos bovinos maduros, após pré- maturação em meio TCM-199+SFB+HS e posterior reversão. (EPV- espaço perivitelínico; CC- Células do *cumulus*; M- microvilosidades; RE- retículo endoplasmático)

a e b; aspecto geral do citoplasma (aumento 3000X). Note a organização das organelas e principalmente das mitocôndrias, por todo o citoplasma. Existem

espaços que formam grupamentos de organelas e espaços vazios. O espaço perivitelínico é bem evidente e as células do *cumulus* estão bem expandidas. c; grânulos corticais isolados e alinhados com a membrana plasmática (setas) (aumento 40000X). d; microvilosidades eretas e bem desenvolvidas e grande quantidade de retículo endoplasmático liso foi encontrada próxima à membrana plasmática (aumento 2500X).

6.2 Experimento 2: Esquema temporal de maturação *in vitro* utilizando pré-maturação-bloqueio (24 horas em meio α -MEMC+PVA com ou sem FSH) e reversão (24 horas em meio controle TCM-199) 48 horas de MIV: Efeito do FSH adicionado ao meio de maturação α -MEMC+PVA, 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 α -MEMC+PVA e analisou-se o efeito da inibição da maturação nuclear (pré-maturação) seguido de maturação e em meio controle (reversão). Como meio controle utilizou-se o TCM-199 e o comparou com o meio α -MEMC+PVA, α -MEMC+PVA+1FSH e α -MEMC+PVA+10FSH durante a pré-maturação oocitária.

A taxa de clivagem (figura 6) e de formação de blastocisto (figura 7) diminuíram consideravelmente no meio α -MEMC+PVA, mesmo na presença de FSH, quando comparado aos meios controle (TCM-199). Estes resultados foram obtidos após o processo de reversão da meiose, ou seja, cultivo de 24 horas com o meio inibidor mais o cultivo de 24 horas suplementares com o meio padrão (TCM-199). Deve-se notar que a produção de blastocistos nos meios α -MEMC+PVA e α -MEMC+PVA+FSH diminuiu ao utilizar o sistema de reversão (figura 7, $p < 0,05$).

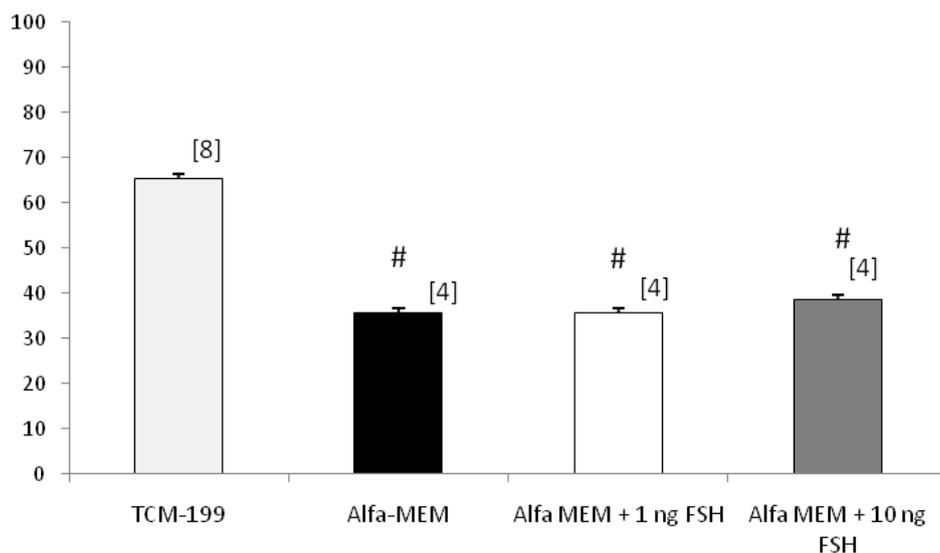


Figura 6: Porcentagem de clivagem após maturação oocitária *in vitro* com reversão nos meios de maturação oocitária testados.

Os resultados foram expressos em média \pm DP. O número de experimentos realizados está representado nos colchetes. Resultados expressos são expressos em porcentagem. Análise de variância indicou as seguintes diferenças estatísticas ($p < 0,001$):

$p < 0,001$ versus TCM199+SFB.

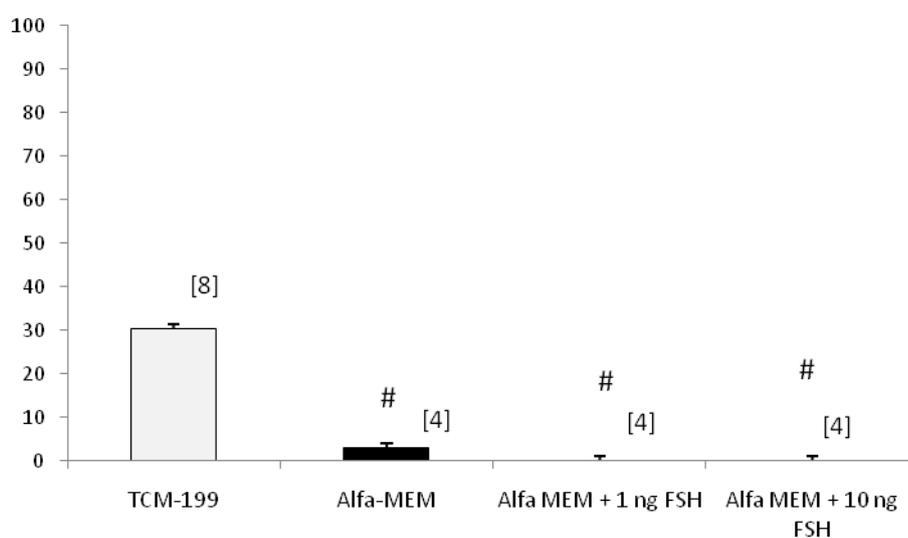


Figura 7: Porcentagem de formação de blastocisto após maturação oocitária *in vitro* com reversão nos meios de maturação oocitária testados.

Os resultados foram expressos em média \pm DP. O número de experimentos realizados está representado nos colchetes. Resultados expressos são expressos em porcentagem. Análise de variância indicou as seguintes diferenças estatísticas ($p < 0,05$):

Alfa-MEM C (reversão), Alfa-MEM C 1ng FSH (reversão) e Alfa-MEM C 10 ng FSH (reversão) é significativamente diferente \$ TCM-199.

6.3 Experimento 3 : Sistema direto de maturação *in vitro* (24 horas): Efeito do FSH adicionado ao meio de maturação α -MEMC+PVA, 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 α -MEMC+PVA e analisou-se o efeito da inibição da maturação nuclear em oócitos incubados durante 24 horas no meio de maturação. Como meio controle utilizou-se o TCM-199 e o comparou com o meio α -MEMC+PVA, α -MEMC+PVA+1FSH e α -MEMC+PVA+10FSH.

Quando foi feita a maturação do oócito com um meio indutor de inibição da meiose durante 24 horas e após foi realizado a fertilização *in vitro*, as taxas de clivagem (figura 8, $p=0,64$) não foram diferentes entre os meios α -MEMC+PVA (com e sem FSH) quando comparados ao meio controle. No entanto as taxas de formação de blastocisto foram menores que o controle (figura 9, $p<0,05$). Já o meio α -MEMC+PVA+10FSH produziu valores próximos ao controle TCM-199.

Para avaliar-se a interação entre o processo de reversão da meiose e os meios de cultivo foi feita a análise de variância de duas vias (ANOVA de duas vias) e demonstrou-se alteração tanto a clivagem do embrião ($p=0,0025$) quanto a formação do blastocisto ($p=0,003$). Portanto, há interação significativa entre o tipo de meio de cultivo e o processo de reversão ou não da meiose nos resultados obtidos.

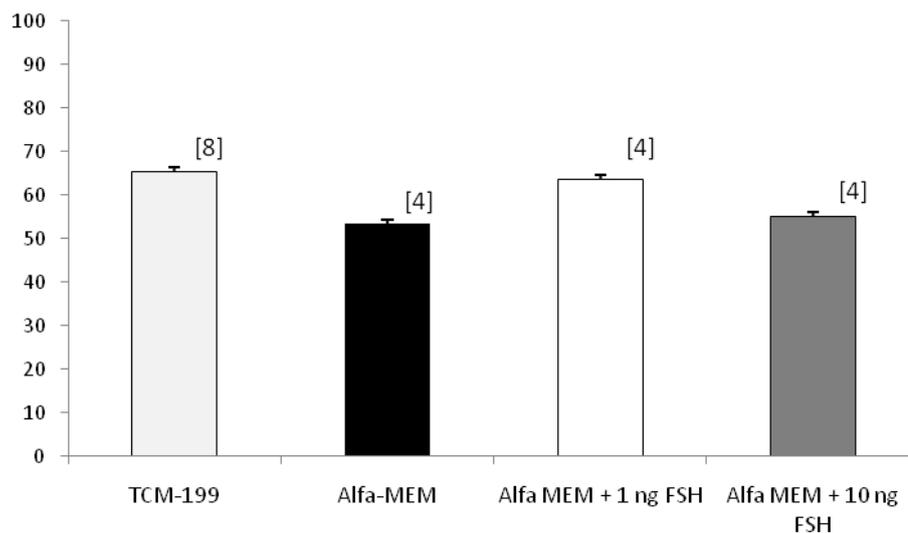


Figura 8: Porcentagem de clivagem após maturação oocitária *in vitro* sem reversão nos meios de maturação oocitária testados.

Os resultados foram expressos em média \pm DP. O número de experimentos realizados está representado nos colchetes. Resultados expressos são expressos em porcentagem. Análise de variância não indicou as diferenças estatísticas ($p = 0,64$).

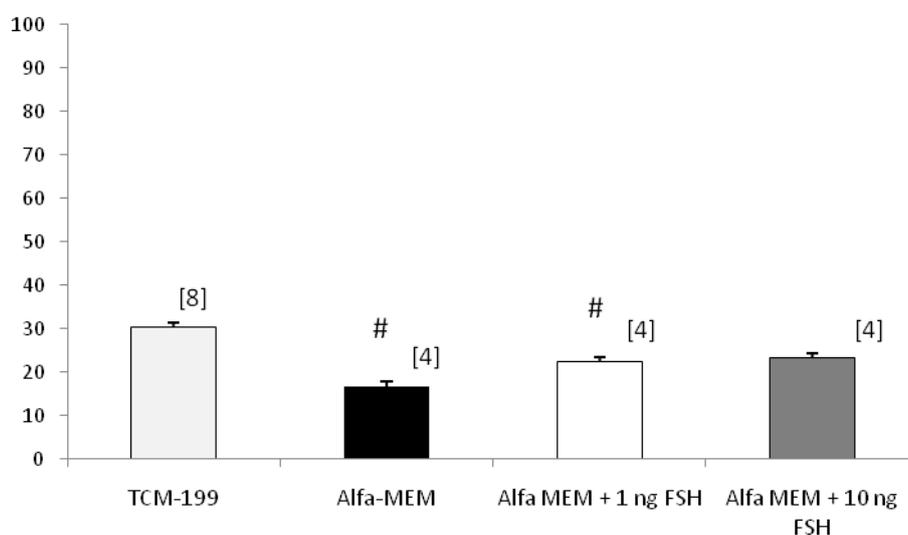


Figura 9: Porcentagem de formação de blastocisto após maturação oocitária *in vitro* sem reversão nos meios de maturação oocitária testados.

Os resultados foram expressos em média \pm DP. O número de experimentos realizados está representado nos colchetes. Resultados expressos são expressos em porcentagem. Análise de variância indicou as seguintes diferenças estatísticas ($p < 0,05$):

Alfa-MEM C, Alfa-MEM C 1ng FSH e Alfa-MEM C 10 ng FSH. é significativamente diferente de

\$ TCM-199 é significativamente diferente Alfa-MEM C e Alfa-MEM C 1ng FSH.

A comparação entre as taxas (Experimentos 2 e 3) de clivagem e formação de blastocisto ao utilizar os sistemas de pré-maturação-reversão (MIV 48 horas) e sistema direto (MIV 24 horas) de maturação em meios α -MEMC+PVA, α -MEMC+PVA+1FSH e α -MEMC+PVA+10FSH (tabela 6), observa-se que os sistema de pré-maturação diminui a taxa de clivagem apenas no meio α -MEMC+PVA+1FSH. No entanto, em todos os meios testados houve diminuição considerável da produção de blastocistos e, nos meios com FSH, houve inibição total da formação de embriões.

Tabela 6: Efeito da Reversão da Meiose sobre a clivagem e formação de blastocisto nos meios Alfa-MEM C, 1 ng ou 10 ng de FSH.

		Sem reversão 24horas	Com reversão 48 horas	Significância estatística (p)
Alfa-MEM C	%Clivagem	53,5 \pm 21,0	35,75 \pm 19,5	0,26
	%Blastocisto	16,79 \pm 2,37	3,13 \pm 4,73*	0,02
Alfa-MEM C 1 ng FSH	%Clivagem	63,75 \pm 11,1	35,75 \pm 13,5*	0,02
	%Blastocisto	22,5 \pm 6,45	0,00*	0,006
Alfa-MEM C 10 ng FSH	%Clivagem	55,25 \pm 10,5	38,75 \pm 9,5	0,06
	%Blastocisto	23,39 \pm 4,18	0,00*	0,0015

Os resultados foram expressos em média \pm DP. Foram realizados 4 experimentos para cada meio com ou sem reversão. Resultados expressos são expressos em porcentagem. Foi realizado teste de *Student*. * diferença do meio sem reversão.

6.4 Experimento 4: Efeito do FSH adicionado ao meio de maturação α -MEMB+PVA, 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 α -MEMB+PVA e analisou-se o efeito da inibição da maturação nuclear em oócitos incubados durante 24 horas no meio de maturação. Como meio controle utilizou-se o TCM-199 e o comparou com o meio α -MEMB+PVA, α -MEMB+PVA+1FSH e α -MEMB+PVA+10FSH (figura 10).

Não houve diferença na porcentagem de oócitos que fecundaram e clivaram entre os meios (% clivagem, $p=0,58$) nem na formação de blastocistos (%blastocisto, $p=0,79$). Portanto, o novo meio formulado (α -MEMB+PVA) se equipara ao melhor meio de cultivo para maturação *in vitro* (TCM-199), utilizado pela maioria dos laboratórios comerciais.

O aspecto microscópico dos oócitos em cultura nos meios TCM-199, α -MEMB+PVA, α -MEMB+1 ng FSH e α -MEMB+10 ng FSH são mostrados nas figuras, 11, 12, 13 e 14, respectivamente.

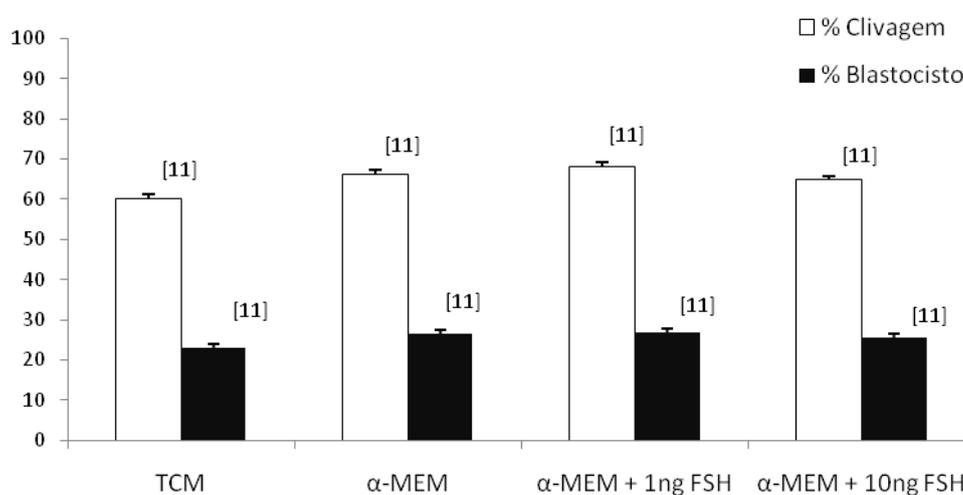


Figura 10: Porcentagem de clivagem e formação de blastocisto após maturação oocitária *in vitro* nos meios testados.

Os resultados foram expressos em média \pm DP. O número de experimentos realizados está representado nos colchetes. Resultados são expressos em porcentagem. Análises de variância não indicaram diferenças estatísticas na porcentagem de clivagem ($p=0,58$) nem na porcentagem de formação de blastocistos ($p=0,79$).



Figura 11: 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).

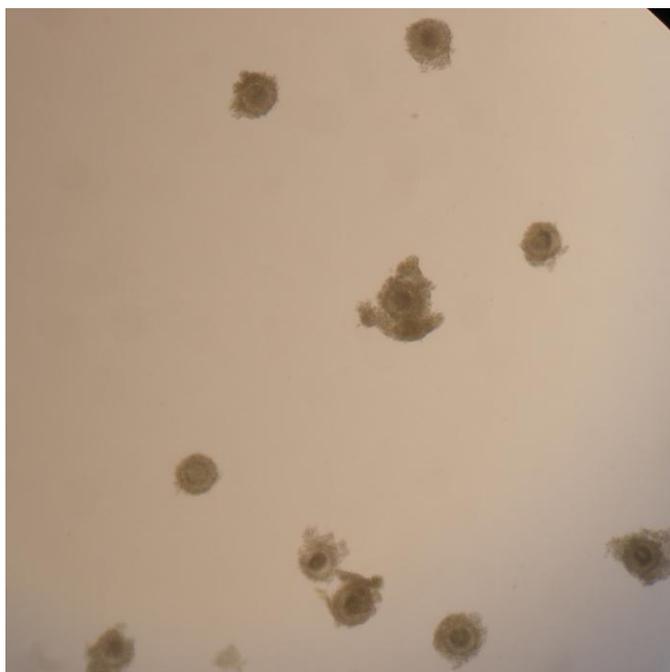


Figura 12: Aspecto morfológico de oócitos cultivados em meio α -MEMB suplementado com PVA após 24 horas de cultivo. Nota-se a não expansão das células do *cumulus* em todos os oócitos, fato indicativo de imaturidade oocitária. Os oócitos encontram-se praticamente isolados, ao contrário do observado no meio controle (aumento 10X).

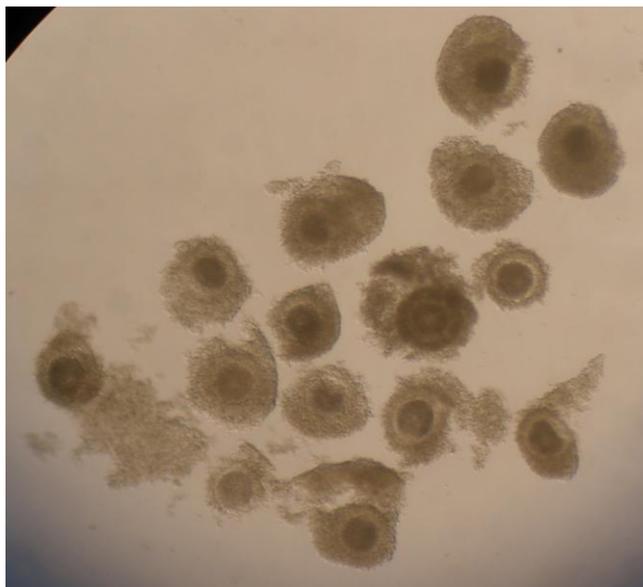


Figura 13: Aspecto morfológico de oócitos cultivados em meio α -MEMB suplementado com PVA e 1 ng de FSH após 24 horas de cultivo. Nota-se a expansão das células do cumulus em todos os oócitos, fato indicativo de maturidade oocitária. Ao contrário de meio α -MEMB+PVA, os oócitos estão mais agrupados, em função da adição de 1ng de FSH (aumento 10X).

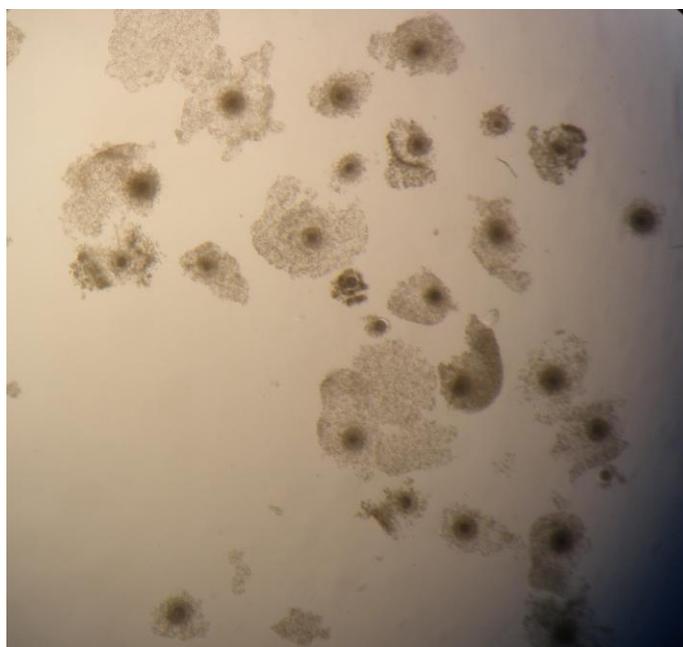


Figura 14: Aspecto morfológico de oócitos cultivados em meio α -MEMB suplementado com PVA e 10 ng de FSH após 24 horas de cultivo. Nota-se a expansão das células do cumulus em todos os oócitos, fato indicativo de maturidade oocitária. Ao contrário de meio α -MEMB+PVA e α -

MEMB+PVA+1FSH, os oócitos estão mais expandidos em função da adição de 10ng de FSH (aumento 10X).

6.5 Experimento 5: Estudo da expressão dos genes de Bax, Bcl-2 e Cx-43 em blastocistos, produzidos após a fertilização de oócitos maturados em meio controle (TCM-199) e o meio α -MEMB+PVA associado ou não ao FSH (1ng ou 10 ng/mL). Resultados preliminares.

No meio TCM-199 foi analisada a expressão dos genes Bax, Bcl2 e Conexina 43 sendo que destes, apenas a expressão da Cx 43 foi observada. No meio α -MEMB+PVA a expressão de nenhum desses genes foi vista. No meio α -MEMB+PVA+1FSH somente o controle positivo GAPDH foi observado. Já no meio α -MEMB+PVA+10FSH foi observada a expressão dos genes Cx 43, Bcl2 e o controle positivo GAPDH. É importante frisar que os resultados obtidos serão repetidos e analisados novamente.

O controle positivo GAPDH foi somente observado nos meios α -MEMB+PVA+1FSH e α -MEMB+PVA+10FSH, não foi observado no meio controle TCM-199 assim como no α -MEMB+PVA por esse motivo não foi possível realizar a análise estatística dos resultados.

Neste trabalho inicial, estávamos padronizando a técnica do RT-PCR.

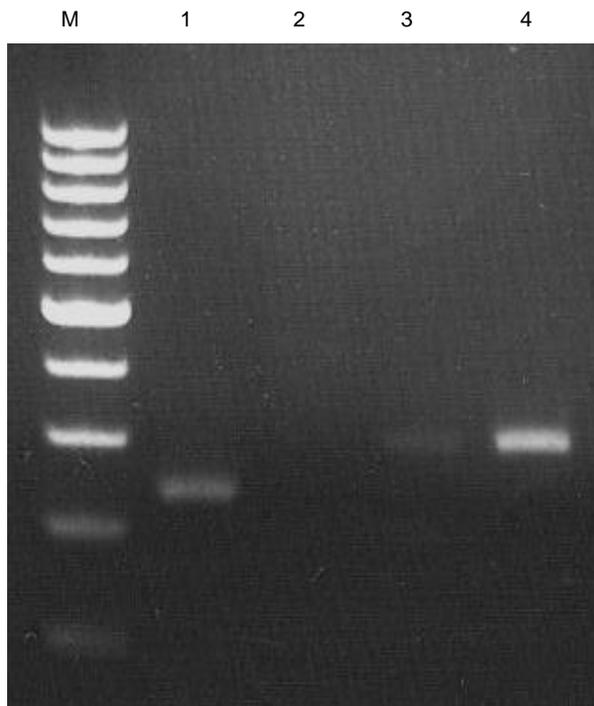


Figura 15. Foto representativa dos produtos de RT-PCR mostrando a expressão da **Connexina 43** nos embriões produzidos nos meios de cultura α -MEMB+PVA+10FSH e TCM-199. Observa-se que o controle positivo **GAPDH** não foi expresso no meio TCM-199. **M**= marcador de 100 pb. **1**= GAPDH α -MEMB+PVA+10FSH. **2** = GAPDH TCM-199. **3** = Connexina 43 α -MEMB+PVA+10FSH. **4**= Connexina 43 TCM-199.

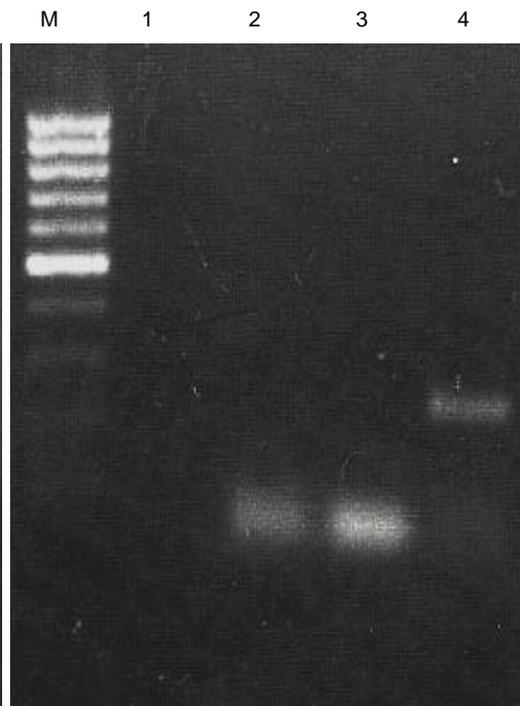


Figura 16. Foto representativa dos produtos de RT-PCR demonstrando que o gene **Bax** não foi expresso, nesse caso, nos meios α -MEMB+PVA e α -MEMB+PVA+10FSH. O controle positivo **GAPDH** foi expresso apenas no meio α -MEMB+PVA+10FSH. **M**= marcador de 100 pb. **1**= Bax α -MEMB+PVA. **2**= Bax α -MEMB+PVA+10FSH. **3**= GAPDH α -MEMB+PVA. **4**= GAPDH α -MEMB+PVA+10FSH.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

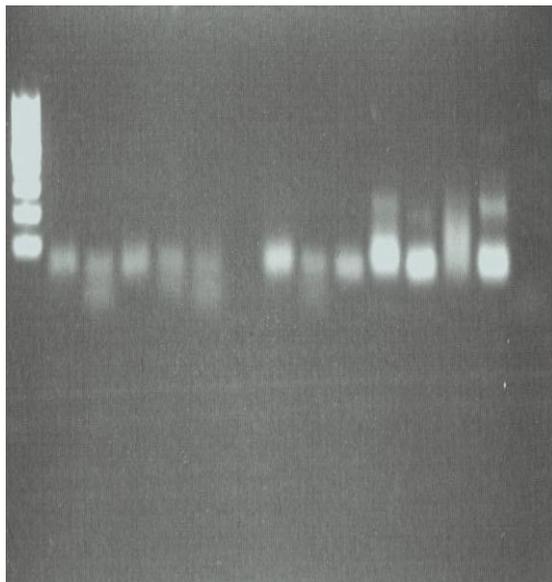


Figura 17. Foto representativa dos produtos de RT-PCR comparando todos os meios de cultura, onde se observou a expressão do GAPDH α -MEMB+PVA+10FSH e α -MEMB+PVA+1FSH e do Bcl-2 α -MEMB+PVA+10FSH. **M**= Marcador de 100 pb. **1**= GAPDH α -MEMB+PVA. **2**= Bcl-2 α -MEMB+PVA. **3**= Bax α -MEMB+PVA. **4**= GAPDH MIV. **5**= Bcl-2 MIV. **6**= Bax MIV. **7**= GAPDH TCM-199. **8**= Bcl-2 TCM-199. **9**= Bax TCM-199. **10**= GAPDH α -MEMB+PVA+10FSH. **11**= Bcl-2 α -MEMB+PVA+10FSH. **12**= Bax α -MEMB+PVA+10FSH. **13**= GAPDH α -MEMB+PVA+1FSH. **14**= Bcl-2 α -MEMB+PVA+1FSH. **15**= Bax α -MEMB+PVA+1FSH.

Tabela 7: Expressão dos genes GAPDH, BAX, BCL-2 e Cx-43 em cada meio avaliado.

TCM-199: controle laboratório, α -MEMB+PVA: meio quimicamente definido. α -MEMB+PVA+1FSH: meio quimicamente definido acrescido de 1ng de FSH. α -MEMB+PVA+10FSH: meio quimicamente definido acrescido de 10ng de FSH. Sinal – como ausência do gene. Sinal + como presença do gene.

	GAPDH	BAX	BCL-2	CX-43
TCM-199	–	+	–	+
α -MEMB+PVA	–	–	–	–
α -MEMB+PVA+1FSH	+	+	–	–
α -MEM+PVA+10FSH	+	–	+	+

7. DISCUSSÃO

Experimento 1: Produção *in vitro* de embriões oriundos da fertilização de oócitos bovinos maturados em meio α -MEMC+PVA+HS, indutores da inibição da maturação nuclear oocitária (OLIVEIRA E SILVA, I 2008).

Uma das principais causas da diminuição do desempenho de oócitos maturados *in vitro* é pelo fato de serem retirados de folículos imaturos, e por isto, ainda não terem passado pelo processo de aquisição de competência que ocorre no final do desenvolvimento folicular, logo após o pico de LH (BREVINI-GANDOLFI e GANDOLFI, 2001). Por este motivo, torna-se necessário o melhoramento da técnica de maturação *in vitro* para permitir que o oócito se desenvolva de forma mimética à situação *in vivo*, ou, pelo menos, de forma menos prejudicial ao desenvolvimento do oócito e do posterior embrião.

Tem sido proposto que duas etapas sejam realizadas antes da fertilização *in vitro*, uma etapa de pré-maturação, onde o oócito tem a meiose bloqueada com o objetivo de sincronizar sua maturação nuclear com a citoplasmática e molecular, seguida da etapa de maturação *in vitro* propriamente dita. Desta forma, o oócito poderá adquirir competência para se desenvolver de forma adequada e dar origem a um embrião competente. Sirard e Coenen (1993), questionaram pela primeira vez sobre a possibilidade de usar um inibidor natural da meiose *in vitro* com este objetivo, uma vez que há a

hipótese de que as células foliculares produzam um fator inibidor que mantém o oócito com a meiose bloqueada.

Posteriormente testado por vários grupos de pesquisa (SIRARD *et al*, 1992) a maturação nuclear foi bloqueada pela presença de fatores da parede folicular durante um período de 24 horas. Richard e Sirard (1996a) demonstram que as células da Teca e não as células da granulosa são as principais atuantes no bloqueio meiótico. O fator inibitório produzido por estas células são solúveis no meio de cultivo e atuam através das células do *cumulus*.

A partir disso, o nosso objetivo foi desenvolver um sistema de pré-maturação oocitária para proporcionar uma indução da inibição da maturação nuclear dos CCOs, no qual foram utilizadas hemi-seções foliculares (HS) em co-cultivo com CCOs bovinos imaturos em meio definido α -MEMC+PVA, comparado com o meio tradicional (TCM-199 +SFB) utilizado como controle. Somente no tratamento TCM-199+SFB (controle) foi observado a maturação nuclear de 83% dos CCOs cultivados.

O tratamento α -MEMC+PVA+HS apresentou características de morte celular (figura 2) tais como citoplasma granulado, que impossibilitou a observação das organelas, membrana plasmática indefinida e sem vilosidades e mitocôndrias sem cristas. De acordo com os resultados da avaliação da maturação nuclear, este tratamento proporcionou aproximadamente 96% de inibição da progressão da meiose, deixando os oócitos no estágio imaturo (Figura 2). Com base nestes resultados, sugere-se que o processo inibitório foi tão intenso a ponto de causar injúrias irreversíveis ao oócito, que o levaram à morte, pois além da inibição causada pela HS (SIRARD *et al*, 1992).

O grupo controle (TCM-199) se comportou da maneira esperada, pois como já é bem estabelecido a presença de soro e FSH no meio de maturação estimulam a maturação oocitária.

O processo inibitório induzido não foi revertido com êxito (reversão da inibição): cerca de 80% dos CCOs permaneceram no estágio imaturo (figura 4), e as características ultra-estruturais dos CCOs também mostraram aspectos de morte celular. Isto sugere que a maioria dos CCOs morreram ainda na pré-maturação, devido ao intenso processo inibitório promovido pela HS somado ao efeito inibitório induzido pelo meio de cultivo.

Sirard e Coenen (1993), obtiveram após o co-cultivo com 1, 2 ou 5 HS, cerca de 90, 50 e 40%, respectivamente, de reversibilidade da inibição da meiose após cultivo em meio livre de inibidores, concluindo que a inibição é reversível a menos que uma grande quantidade de tecido seja colocada no co-cultivo, que pode causar injúrias ao oócito. Como no presente trabalho a taxa de reversibilidade foi menor do que a encontrada por Sirard e Coenen (1993), porém foram utilizadas 10 HS / co-cultura, ou seja uma grande quantidade de tecido folicular, que pode ter causado danos irreversíveis aos oócitos, gerando uma baixa taxa de reversibilidade.

Pesquisas demonstram uma baixa taxa de reversibilidade da inibição da meiose após o co-cultivo com 2 HS, no entanto, eles relacionaram esta taxa com o volume de meio de maturação utilizado durante a segunda etapa do processo, ou seja, durante o período de cultivo na ausência de inibidores. Para o volume de 0,1 mL de meio, foi detectado que somente 13% dos CCOs tiveram a meiose retomada após 12 horas de pré-maturação seguidas de 12 horas de cultivo na ausência de inibidores, enquanto que para os volumes de 0,5 e 2,0 mL, o potencial de reversibilidade subiu para 40 e 38%, respectivamente. Eles concluíram que um maior volume de meio seria capaz de diluir possíveis fatores tóxicos ao oócito, no entanto, como a porcentagem de oócitos maduros não aumentou com o aumento do volume de 0,5 para 2,0 mL, novos estudos são necessários para este esclarecimento.

Levando em consideração as conclusões de Sirard e Coenen (1993), pode-se sugerir que o potencial de reversibilidade de inibição da meiose depende da relação quantidade de tecido folicular : volume de meio de cultivo.

No tratamento α -MEMC+PVA+HS, cuja taxa de reversibilidade foi a menor observada entre os grupos testados (~16%), vale a pena ressaltar que além da inibição causada pela presença das HS, ainda houve a inibição induzida pelo meio de cultivo α -MEMC+PVA que pode ter provocado uma inibição da meiose muito intensa ao ponto de ocasionar danos à maquinaria dos oócitos, impedindo-os de retomar a meiose e levando-os à morte.

Experimento 2: Esquema temporal de maturação *in vitro* utilizando pré-maturação-bloqueio (24 horas em meio α -MEMC+PVA) e reversão (24 horas em meio controle TCM-199) 48 horas de MIV: Efeito do FSH adicionado ao meio de maturação α -MEMC+PVA, indutor da inibição da maturação nuclear oocitária, sobre a produção *in vitro* de embriões oriundos da fertilização destes oócitos bovinos.

Experimento 3: Sistema direto de maturação *in vitro* (24 horas): Efeito do FSH adicionado ao meio de maturação α -MEMC+PVA, indutor da inibição da maturação nuclear oocitária, sobre a produção *in vitro* de embriões oriundos da fertilização destes oócitos bovinos.

No presente estudo, os resultados referentes ao percentual de zigotos (percentual de clivagem) e blastocistos no cultivo dos diferentes meios de pré-maturação e reversão da meiose estão descritos nas figuras 6, 7 e tabela 6. O processo de reversão da meiose diminuiu a clivagem (avaliado no terceiro dia após a fertilização, figura 6) e a formação de blastocisto (avaliado no sétimo dia após a fertilização, figura 7) nos meios α -MEMC+ PVA, suplementados ou não com FSH.

Quando não foi realizada a pré-maturação, através da inibição da meiose, a taxa da clivagem não foi diferentemente significativa entre os meios testados (tabela 6), porém a taxa de formação de blastocisto nos meios α -MEMC + PVA e α -MEMC+PVA+1 ng de FSH foi inferior ao meio controle (TCM-199) (figura 9). Apenas o α -MEMC+PVA+10 ng de FSH foi comparável ao meio TCM-199.

Na avaliação da clivagem e formação de blastocistos entre os meios α -MEMC+PVA com ou sem FSH observou-se que o efeito da reversão foi negativo (tabela 6). A clivagem foi alterada apenas no meio suplementado com 1 ng de FSH. Nos outros meios os dois parâmetros estudados foram influenciados negativamente pela processo de inibição e reversão da meiose.

Vários pesquisadores demonstraram que é possível produzir embriões *in vitro* em sistemas de maturação sem a adição de fontes protéicas de origem animal, porém, na fecundação, as proteínas parecem ter um papel importante na antecipação da formação dos pró-núcleos. Os autores verificaram queda significativa nas taxas de clivagem e, posteriormente, de blastocistos, quando

submeteram os CCO ao processo de FIV sem fonte protéica. Ainda há muito a esclarecer, pois não se obteve sucesso na PIV de embriões bovinos em um sistema totalmente livre de proteínas nas três etapas da produção: maturação, fecundação e cultivo. Embora o ideal seja cultivar embriões em condições definidas, livres de agentes exógenos, estes meios ainda são pouco aplicados na PIV comercial.

Estes estudos foram conduzidos para verificar o efeito da MIV em meio de cultura definido α -MEMC que é um meio suplementado com IGF-1/insulina e PVA ou BSA. Oócitos maturados nestas condições de cultura apresentaram o mesmo potencial de serem transformados em blastocistos da mesma maneira que oócitos maturados em condições controle, em meio não definido na presença de soro. Demonstra-se na literatura 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 (ALI E SIRARD, 2002). Trabalho recente de nosso grupo mostra que tanto o PVA como o PVP-40 podem substituir o BSA ou soro (VIREQUE et al., 2009).

No presente trabalho IGF-1 e insulina foram adicionados ao meio de maturação com PVA e podem ter contribuído para o sucesso da maturação e do desenvolvimento embrionário, na presença ou ausência de FSH. O uso de gonadotrofinas na MIV tem sido considerado importante para o desenvolvimento embrionário é indicado para o meio de maturação 49 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 há uma forte corrente que caminha na direção de estabelecer a importância do FSH principalmente em baixas concentrações sobre o crescimento *in vivo* (SIRARD, 2007) 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 (FARIN *et al*, 2007). 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 é efetivo em

meio definido para aumentar o desenvolvimento embrionário (figura 9) na qual o FSH 10 ng é capaz de reverter a inibição provocada pelo meio α -MEMC+PVA. O efeito do FSH parece depender também da presença de soro no meio de maturação, pois a taxa de oócitos meioticamente maturados é maior na presença de soro.

Experimento 4: Efeito do FSH adicionado ao meio de maturação α -MEMB+PVA, indutor da inibição da maturação nuclear oocitária, sobre a produção *in vitro* de embriões oriundos da fertilização destes oócitos bovinos.

Este estudo contrasta as influências da maturação *in vitro* de oócitos bovinos em diferentes meios de cultura. Os nossos resultados indicam que o meio α -MEMB+PVA pode ser efetivamente utilizado para maturação oocitária e posteriormente produção de embriões.

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. Oócitos maturados com α -MEMB+PVA acrescidos ou não de FSH resultaram na mesma quantidade de blastocistos quando comparáveis aos observados no controle TCM-199 (figura 10).

O desenvolvimento pré-implantação do embrião é caracterizado por distintas etapas biológicas, incluindo a primeira divisão da clivagem, ativação do genoma embrionário, a compactação e a formação do blastocisto. Estes processos são precisamente determinados pela correta expressão de genes derivados do genoma materno e/ ou embrionário.

Estudos recentes têm demonstrado que as condições de cultura influenciam a quantidade de transcritos de genes reguladores do desenvolvimento e induzem *down regulation* ou expressão de novos genes durante o desenvolvimento pré-implantação. Em adição, embriões bovinos produzidos em sistemas de cultura quimicamente definidos ou não definidos apresentam diferentes padrões de transcrição do RNAm. A suplementação dos

meios de cultura com soro induz alterações na transcrição gênica independente do estágio da cultura. O soro é requerido para o cultivo de células somáticas e tem sido frequentemente usado como fonte de nitrogênio nos meios de cultura para o embrião. Entretanto, é preciso considerar que o soro contém muitos peptídeos, proteínas e numerosas moléculas não definidas, às quais o oócito e embrião nunca são expostos *in vivo*.

Alterações na expressão de transcritos maternos foram observadas por Watson e colaboradores (2000) durante a maturação *in vitro*. Oócitos bovinos maturados em meio desprovido de aminoácidos apresentaram declínio de RNAm da subunidade $\alpha 1$ da enzima Na^+/K^+ -ATPase e da ciclina A. Estas alterações também foram acompanhadas de redução das taxas de desenvolvimento até o estágio de blastocisto (WATSON *et al*, 2000).

De acordo com os resultados do presente estudo, não foram observadas diferenças nos índices de produção *in vitro* de embriões, mensurados pelas taxas de formação de blastocistos e eclosão, entre os meios controles suplementados com soro e o meio quimicamente definido suplementados com macromoléculas e acrescidos ou não de FSH. Como observado por Watson e colaboradores (2000), condições sub-ótimas de cultura durante a maturação podem ser restritivas ao desenvolvimento. Nossos resultados demonstram que oócitos bovinos maturados em meio α -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. Embora a taxa de clivagem tenha sido superior no grupo controle, os embriões derivados de oócitos maturados em sistema definido apresentaram a mesma proporção de embriões no estágio de 9-16 células após 68-72 horas quando comparados ao meio de maturação contendo soro. Este período está associado com a transição materno-zigótica, quando a regulação epigenética da expressão do genoma embrionário é particularmente sensível aos fatores externo. Portanto, é um período importante para a reprogramação da expressão gênica, a qual é essencial para o desenvolvimento subsequente. A taxa de eclosão, baseada no número total de blastocistos também foi similar entre os blastocistos resultantes de oócitos cultivados em meio com ou sem soro e gonadotrofinas. A eclosão é uma

indicação da competência para o desenvolvimento de um blastocisto (BAVISTER, 1995), sendo um bom indicador para a avaliação da viabilidade do embrião (CAMARGO *et al*, 2005).

Inversamente ao cultivo em TCM com soro, não foi observada a expansão do *cumulus oophorus* quando os oócitos foram cultivados em meio α -MEMB, provavelmente devido a ausência do soro (figuras 11, 12, 13 e 14). Estes resultados confirmam os achados de Ali e Sirard (2002) em meio SOF suplementado com PVP-40 e indicam que durante a maturação do oócito bovino a expansão do cumulus não está diretamente relacionada á expressão de competência citoplasmática (ALI & SIRARD, 2002).

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 (OLSON SE, 1991; TROUNSON *et al.*, 1994) e a suplementação do meio de cultura do oócito com gonadotrofinas exógenas ainda é controversa (ALI & SIRARD, 2002).

Este experimento contrasta com outros trabalhos que mostra a importância do meio TCM 199 na maturação oocitária visando a produção de embriões competentes. Tanto o meio α -MEMC e α -MEMB podem ser perfeitamente utilizados para a MIV, sendo que o α -MEMB poderia ser considerado melhor, pois o α -MEMC produz uma menor quantidade de embriões do que o α -MEMB que produz quantidades de embriões semelhantes aos controles. O FSH 10 ng tem importância quando utilizado no α -MEMC, pois reverte uma inibição promovida por este meio, ainda desconhecida. As vantagens do meio α -MEMB em relação ao meio TCM199 são que, não necessita de FSH e pode substituir perfeitamente qualquer meio de maturação existente tanto em laboratórios de pesquisa como comerciais.

Experimento 5: Estudo da expressão do RNAm de Bax, Bcl-2 e Cx-43 em blastocistos produzidos após a fertilização de oócitos maturados em meios controle (TCM-199) e o meio α -MEMB +PVA associado ou não ao FSH (1ng ou 10 ng/mL). Resultados preliminares.

Nos experimentos iniciais, a quantidade de embriões utilizada para a extração de mRNA foi entre 2-8 embriões por amostra. Após a extração de mRNA, o *pelet* obtido era ínfimo e quando se quantificava a quantidade era bem pequena, mas mesmo assim o RT-PCR foi realizado. No entanto, não se observou a expressão do controle interno e de nenhum dos genes. Logo, foi questionado que a quantidade de amostra era muito pequena para a realização do procedimento e então, a amostra foi aumentada para 18-20 embriões e assim foi conseguido posteriormente os resultados. Com isso, esta quantidade de embriões foi considerada a mínima para a realização dos experimentos.

O meio de cultura usado como controle é considerado um meio de referência e o mesmo apresentou apenas a expressão do gene conexina 43 (figura 15). Curiosamente, o meio α -MEMB+PVA+10FSH, meio definido e patenteado, apresentou a expressão do maior número de genes e inclusive o controle positivo GAPDH e não foi observada a expressão do Bax o que agrega um valor maior a esse meio em relação aos outros analisados, principalmente os comercialmente utilizados (figuras. 15, 16 e 17).

Os meios α -MEMB+PVA são acrescidos de 1ng ou 10ng de FSH respectivamente. Os embriões produzidos no meio α -MEM+PVA não expressaram nenhum dos genes dos quais nele foi analisado. No meio α -MEMB+PVA+1FSH foi expresso apenas o controle positivo GAPDH. Já no meio α -MEMB+PVA+10FSH foi apresentada a expressão da Conexina 43, Bcl-2 e o controle positivo GAPDH e o Bax não foi expresso. Isso pode corroborar a idéia de que o acréscimo de FSH no meio de cultura pode interferir na expressão de determinados genes associados à viabilidade do embrião.

Com relação ao GAPDH, por ter sido usado como controle interno, esperava-se que ele fosse expresso nos embriões produzidos nos diferentes meios de cultura. No entanto, foi notado que em apenas alguns grupos de embriões houve a expressão de tal gene. Estudos demonstraram que o

GAPDH parece funcionar mais como um marcador de viabilidade do que com um controle interno. Dessa forma os resultados obtidos foram interessantes e mostram grande importância para os meios α -MEMB+PVA+10FSH e α -MEMB+PVA+1FSH.

Na literatura há inúmeros estudos que utilizam como ferramenta a técnica de *Real Time* RT-PCR, mais refinada e sensível, para a análise da viabilidade de embriões bovinos. No entanto quando foi proposto este trabalho a técnica não estava padronizada e disponível para a realização dos experimentos. Então, devido à urgência de avaliar os meios de cultura e a concretização do trabalho o RT-PCR foi realizado.

Contudo, os resultados obtidos mostram que o RT-PCR pode ser uma ferramenta indicativa na análise da expressão de marcadores de viabilidade de embriões, mas não com tanta eficiência quanto às pesquisas atuais usando *real-time* RT-PCR demonstram. Portanto, o método não pôde ser amplamente validado.

8. CONCLUSÕES

Neste trabalho associamos a utilização de dois meios de cultura para a maturação oocitária α -MEMC+PVA e α -MEMB+PVA. O PVA foi utilizado como macromolécula substituto do soro. O meio α -MEMC+PVA é composto, além do α -MEM que é diluente, de hormônios (insulina, androstenediona), fatores de crescimento (IGF-1) e agentes antioxidantes e aminoácidos. No meio α -MEMB+PVA não há hormônios e fatores de crescimento. O efeito do FSH (1ng e 10 ng) foi testado nestes dois meios e em dois sistemas de MIV. O cultivo durante 48 horas que envolvem o bloqueio (24 horas em meio teste) e a reversão da maturação nuclear (24 horas em meio TCM-199), e o cultivo durante 24 horas que envolve bloqueio e reversão no mesmo meio teste de cultura.

Foi avaliada a taxa de clivagem e a taxa de blastocistos oriundos da fertilização de oócitos submetidos a MIV, nas condições citadas anteriormente.

1. O sistema de pré-maturação ou bloqueio-reversão α -MEMC+PVA (MIV durante 48 horas) não foi eficiente, nem na taxa de clivagem assim como na produção de blastocistos, tendo em vista que após MIV durante 48 horas a taxa de clivagem e de blastocisto é menor aproximando-se de zero. O FSH não alterou o bloqueio na produção de embriões.

Deste ponto em diante todos os experimentos foram realizados com MIV durante 24 horas, nos meios testes.

2. O meio α -MEMC+PVA produziu taxa semelhante de clivagem e menor taxa de blastocisto. Semelhantes resultados foram obtidos após a adição de FSH 1ng. Contudo, a adição de 10 ng de FSH produziu taxas semelhantes tanto de clivagem assim como de blastocistos. Portanto este é um efeito do FSH na maturação que aumenta a produção de embriões.
3. A MIV no meio α -MEMB+PVA, promove um bloqueio da expansão das células do cumulus, e a adição do FSH promove a expansão de maneira dose dependente, não atingindo expansão semelhante a observada no controle. Este resultado indica que o α -MEMB+PVA é eficiente em bloquear a maturação oocitária.
4. O meio α -MEMB+PVA associado ou não ao FSH na MIV, produz mesma taxa de clivagem e mesma taxa de blastocisto que o controle. Portanto quando a MIV ocorre na ausência de hormônios e fatores de crescimento, ainda assim os oócitos são maturados de maneira semelhante aos controles, quando se avalia a embriogênese precoce. A adição de FSH não altera esta resposta.
5. Os blastocistos oriundos de oócitos maturados no meio α -MEMB+PVA verificou-se que a presença de FSH 10ng leva a expressão dos genes GAPDH, Cx-43 e Bcl-2. Este fato poderia ser indicativo de que os blastocistos produzidos pudessem ser mais competentes. Resultados preliminares.

9. REFERÊNCIAS

ADONA P.R; LEAL C.L.V. Meiotic inhibition with different cyclin-dependent kinase inhibitors in bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. **Zygote**, v.12, p.197–204, 2004.

AKTAS, H. et al. Meiotic state of bovine oocytes is regulated by interactions between cAMP, cumulus, and granulosa. **Mol Reprod Dev**, v.65, n3, Jul, p.336-43. 2004.

ALI, A.; COENEN, K.; BOUSQUET, D.; SIRARD, M.A. Origin of bovine follicular fluid and its effect during *in vitro* maturation on the developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, 62: 1596-1606, 2005.

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. **Biology of reproduction**, 66: 901-905, 2002.

BACHVAROVA, R.; MOY, K. Autoradiographic studies on the distribution of labeled maternal RNA in early mouse embryos. **J Exp Zool**, V 223, n 3, Mar, p 397-403.1985.

BAVISTER B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Human Reprod Update**, 2:91-148. 1995.

BINOR, Z., WOLF, D. P. In vitro maturation and penetration of mouse primary oocytes after removal of the zona pellucid. **J Reprod Fertil**, v. 56, n 1, May p. 309-14. 1979.

BLONDINI, P. et al. The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. **Theriogenology**, v.48, n 5, Oct1, p. 803-13.1997.

BOEDIONO A, SUZUKI T, GODKE RA. Comparison of hybrid and purebred *in vitro*-derived cattle embryos during *in vitro* culture. **Anim Reprod Sci**, v.78, p.1-11. 2003

BREDBACKA K, BREDBACKA P. Glucose controls sex-related growth rate differences of bovine embryos produced *in vitro*. **J Reprod Fertil**, v. 106, p.169-172. 1996.

BREVINI-GANDOLFI, T.A. et al. Changes in ply (A) tail length of maternal transcripts during in vitro maturation of bovine oocytes and their relation with developmental competence. **Mol Reprod Dev**, v.52, n4, Apr, p.427-33. 1999.

BREVINI,T.A.L.,CILLO, F.,ANTONINI, A., TOSETTI, V., GANDOLFI, F. Temporal and spatial control of gene expression in early embryos of farm animals. **Reprod Fert Dev.**, v. 19, p.35-42, 2007.

BREVINI-GANDOLFI, T.A.L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, 55: 1255-1276, 2001.

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.

CALDER MD, CAVENEY AN, SIRARD MA, WATSON AJ. Effect of serum and cumulus cell expansion on marker gene transcripts in bovine cumulus-oocytes complexes during maturation *in vitro*. **Fertil Steril**, v.83, p.1077-1085, 2005.

CAMAIONI, A. et al. Effects of exogenous hyaluronic acid and serum on matrix organization and stability in the mouse cumulus cell-oocyte complex. **J Biol Chem**. V. 268, n 27, Sep 25, p. 20473-81. 1993.

CAMARGO LSA, SÁ WF, FERREIRA AM, VIANA JHM, ARAÚJO MCC. Efeito de concentração espermática e período de incubação oócitoespermatozóide na fecundação *in vitro* em bovinos da raça Gir. **Pesq Agrop Bras**, v. 37, p.709-715. 2002.

CAMARGO LSA, VIANA JHM, SÁ WF, FERREIRA AM, VALE FILHO VR.. Developmental competence of oocytes from prepubertal *Bos indicus* crossbred cattle. **Anim Reprod Sci**. v. 85, p. 53-59. 2005.

CHEN, L. et al. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. **Mol Reprod Dev**, v.34, n 1, Jan, p. 87-93. 1993.

CHERYL, L.A.; GITTENS, J.E.I.; O'BRIEN, M.J.; EPPIG.J.J.; KIDDER, G.M. Intercellular communication via connexin 43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. **Developmental Biology**, 233: 258-270, 2001.

CHERR, G. et al. Organization of the hamster cumulus extracellular matrix: a hyaluronato-glycoprotein gel which modulates sperm access to the oocyte. **Develp Growth Differ**, v 32, p. 353-365. 1990.

CHIAN, R. C. et al. Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, v41, n7, p. 1499-508. 1994.

COHEN, G.M. Caspases: the execution of apoptosis. **Biochem J**, v. 326, (Pt 1), Aug 15, p. 1-16. 1997.

COLEMAN, N.V.; SHAGIAKHMETOVA, G.A.; LEBEDEVA, I.Y.; KUZMINA, T.I.; GOLUBEV, A.K. *In vitro* maturation and early developmental capacity of bovine oocytes cultured in pure follicular fluid and supplementation with follicular wall. **Theriogenology**, 67: 1053-1059, 2007.

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.

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.

D'ALESSANDRIS, C. et al. Control of mouse cumulus cell-oocyte complex integrity before and after ovulation: plasminogen activator synthesis and matrix degradation. **Endocrinology**, v. 142, n 7, Jul, p. 3033-40. 2001.

DE SOUZA, P.A.; WATSON, A.J.; SCHULTZ, G.A. *et al.* Oogenic and zygotic gene expression directing early bovine embryogenesis: a review. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, p. 112-121, 1998.

DIELEMAN SJ, HENDRIKSEN PJM, VIUFF D, THOMSEN PD, HYTTEL P, KNIJIN HM, WRENZYCHI C, KRUIP TAM, NIEMANN H, GADELLA BM, BEVERS MM, VOS PLAM. Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, v. 57, p.5-20, 2002.

DODE, M.A.N.; ADONA, P.R. Developmental capacity of *Bos indicus* oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6-DMP. **Animal Reproduction Sci.**, v. 65, p. 171-180, 2001.

DUCKWORTH BC, WEAVER JS, RUDERMAN JV. G2 ARREST IN. *Xenopus* oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase. **A. PNAS**, v. 99, p.16794-16799, 2002.

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.

DURANTHON, V. RENARD, J.P. The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. **Theriogenology**, v. 55, n.6. Apr1, p. 1277-89. 2001.

EBERLING S, SHUON C, MEINECKE B. Mitogen-activated protein kinase phosphorylation patterns in pig oocytes and cumulus cells during gonadotrophin-induced resumption of meiosis in vitro. **Zygote**, v.15, p.139-147, 2007.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Mol. Reprod. Dev.**, 42: 437-442, 1995.

FAIR T, CARTER F, PARK S, EVANS ACO, LONERGAN P. Global gene expression analysis During bovine oocyte in vitro maturation. **Theriogenology**, doi:10.1016/j.theriogenology.2007.04.018.

FARIN CE, RODRIGUEZ KF, ALEXANDER JE, HOCKNEY JE, HERRICK JR, KENNEDY-STOSKOPF. The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation *in vitro*. **Anim Reprod Sci**, v.98, p.97-112, 2007.

FARIN PW, CROSIER AE, FARIN CE.. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology** , v.55, p. 151-170. 2001.

FARIN PW, PIEDRAHITA JA, FARIN CE. Errors in development of fetuses and placentas from *in vitro* produced Mbovine embryos. **Theriogenology** v. 65, p. 178-191. 2006.

FISCHER AE, BERNAL DP, GUTIERREZ-ROBAYO C, RUTLEDGE JJ. Estimates of heterosis for *in vitro* embryo production using reciprocal crosses in cattle. **Theriogenology**, v. 54, p. 1433-1442. 2000.

FISCHER B, BAVISTER BD. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. **J Reprod Fertil.** v. 99, p. 673-679. 1993.

FISSORE RA, HE CL, VAN DE WOUDE, GF. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. **Biol. Reprod.**, v. 55, p. 1261-1270,1996.

FOOTE, W.D.; THIBAUT, C. Recherches expérimentales sur la maturation *in vitro* des ovocytes de truie et de veau. **Am Biol Anim Bioch Biophys.** 3: 329-349, 1969. *apud* SIRARD MA, COENEN K, BILODEAU S. Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. **Theriogenology.** 37: 39-57, 1992.

FU M, CHEN X, YAN J, LEI L, JIN S, YANG J, SONG X, ZHANG M, XIA G. Luteinizing hormone receptors expression in cumulus cells closely related to mouse oocyte meiotic maturation. **Frontiers in Bioscience**, v.12, p.1804-1813, 2007.

FULLOP, C. et al. Coding sequence of a hyaluronan synthase homologue expressed during expansion of the mouse cumulus-oocyte complex. **Arch Biochem Biophys**, v. 337, n 2, Jan15, p. 261-6. 1997.

GARDNER DK. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. **Cell Biology International**, 18(12):1163-1179. 1994.

GARDNER DK. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. **Theriogenology**. v. 49, p. 83- 102. 1998.

GILCHRIST RB, THOMPSON JG. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v.67, p.6-15, 2007.

GOREN S, DEKEL N. Maintenance of meiotic arrest by a phosphorylated p34cdc2 is dependent of cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate. **Biol. Reprod**, v. 51, p.956-962, 1994.

GORDON I..**Laboratory production of cattle embryos**. London: Cambridge University Press, 640pp. 1994.

GUTIERREZ-ADAM A, RIZOS D, FAIR T, MOREIRA P M, PINTADO B, DE LA FUENTE J, BOLAND MP, LONERGAN P. Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured in vivo or in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 68, p.441-448, 2004.

GUTIÉRREZ, C. G.; CAMPBELL, K.; WEBB, R. Development of a Long-Term Bovine Granulosa Cell Culture System: Induction and Maintenance of Estradiol Production, Response to Follicle- Stimulating Hormone, and Morphological Characteristics. **Biology of Reproduction**, 56: 608-616, 1997.

HANSEN PJ.. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Anim Reprod Sci**. v82/83, p.349-360. 2004.

HARVEY AJ, KIND KL, PANTALEON M, ARMSTRONG DT, THOMPSON JG.. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. **Biol Reprod** ,v. 71, p.1108-1119. 2004.

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.

HOLM P, CALLESEN H. *In vivo* versus *in vitro* produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. **Reprod Nutr Dev.**; v. 38: p. 579-594. 1998.

HOLM P, BOOTH PJ, SCHMIDT MH, GREVE T, CALLESEN H. High bovine blastocysts development in a static *in vitro* production systems using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**. v. 52, p. 883-700. 1999.

HUMBLOT, 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.

HYTTEL P, FAIR T, CALLESEN H, GREVE T.. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**. v 47, p.23-32. 1997.

ITANO, N. , KIMATA, K. Expression cloning and molecular characterization of HAS protein, a eukaryotic hyaluronan synthase. **J Biol Chem**. V. 271, n. 17, Apr 26, p. 9875-8. 1996.

JOYCE, I.M. et al. Comparison of recombinant growth differentiation factor-9 and oocyte regulation of KIT ligand messenger ribonucleic acid expression in mouse ovarian follicles. **Biol Reprod**, v. 63, n 6, Dec, p. 1669-75. 2000.

KESKINTEPE L, BRACKETT BG. *In vitro* developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. **Biol Reprod** 1996; 55:333–339. KIDDER GM. The genetic program of preimplantation development. **Dev Genet**, 13:319-325. 1995.

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.

KHATIR, H, LONERGAN, P, CAROLAN, C, MERMILLOD, P. Prepubertal bovine oocyte: a negative model for studying oocyte developmental competence. **Mol Reprod Dev**. v 45, p.231-239. 1996.

KHURANA NK, NIEMANN H.. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocystformation of bovine embryos. **Theriogenology**, V.54, p.741-756.2000.

KIM, K. S. et al. Follicular cells affect the fertilizability and developmental competence of bovine oocyte in vitro. **Reprod Fertil Dev**. V.9, n.8, p. 763-6. 1997.

KIMURA, N. et al. Expression of hyaluronan synthases and CD44 messenger RNAs in porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. **Biol Reprod**. V. 66, n 3, Mar, p. 707-17. 2002.

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.

KUBELKA M, MOTLIK J, SSCHULTZ RM, PAVLOK A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. **Biol Reprod**, v.62, p.292-302, 2000.

LANE M.. Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress *in vitro*. **Theriogenology**. v 55, p. 225-236. 2001

LANUZA, G.M.; FICHIMAN, M.L.; BARAÑAO, J.L. Growth promoting activity oocytes on granulose cells is decreased upon meiotic maturation. **Dev. Biology**, v. 197 (1), p. 129-139, 1998.

LARSSON B, RODRIGUEZ-MARTINEZ H.. Can we use *in vitro* fertilization tests to predict semen fertility? ***Anim Reprod Sci*** . v.60-61, p.327-336. 2000.

LECHNIAK D, CIESLAK D, SOSNOWSKI J. Cytogenetic analysis of bovine parthenotes after spontaneous activation *in vitro*. ***Theriogenology***. V 49, p.779-785. 1998,

LECHNIAK D, KACZMAREK D, STANISLAWSKI D, ADAMOWICZ T.. The ploidy of *in vitro* matured bovine oocytes is related to the diameter. ***Theriogenology***. V.57, p.1303-1308. 2002.

LEE ES, FUKUI Y, LEE BC, LIM JM, HWANG WS. Promoting effect of amino acids added to a chemically defined medium on blastocyst formation and blastomere proliferation of bovine embryos cultured *in vitro*. ***Anim Reprod Sci***. v. 84, p.257-267. 2004.

LEIBFRIED-RUTLEDGE ML.. Factors determining competence of *in vitro* produced cattle embryos. ***Theriogenology*** v. 51, p.473-485. 1999.

LEQUARRE AS, MARCHANDISE J, MOREAU B, MASSIP A, DONNAY I. Cell cycle duration at the time of maternal zygotic transition for *in vitro* produced bovine embryos: effect of oxygen tension and transcription inhibition. ***Biol Reprod.***, v 69, p.1707-1713. 2004.

LIU, X. et al. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. ***Cell***, v. 89, n. 2, Apr 18, p. 175-84. 1995

LOEWENSTEIN, W.R. The cell-to-cell channel of gap junctions. ***Cell***, v.48, n 5, Mar13, p.725-6.1987.

LONERGAN P, RIZOS D, GITIERREZ-ADAN A, MOREIRA PM, PINTADO B, DE LA FUENTE J, BOLAND MP. Temporal divergence in the pattern of

messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro and in vivo. **Biol Reprod**, v.69, p.1424-1431, 2003b.

LONERGAN, P. et al. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-1 growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. **Mol Reprod Dev**. V.57, n 2, Oct, p. 146-52. 2000.

LONERGAN P, RIZOS D, WARD F, BOLAND MP. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. **Reprod. Nutr. Dev**, v.41, p.1-11, 2001.

LONERGAN, P. et al. Development of bovine embryos in vitro following oocyte maturation under defined conditions. **Reprod Nutr Dev**, v. 34, n 4, p. 329-39. 1997.

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.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D. *et al.* Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v.37, p.48-53, 1994.

LUSSIER JG, MATTON P, DUFOUR JJ. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **J Reprod Fertil**. V. 81, p.301-307. 1987.

MARCHAL, R. et al. Effect of growth hormone (GH) on in vitro nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, cumulus expansion,, hyaluronan synthases, and connexins 32 and 43 expression, and GH receptor messenger RNA expression in equine and porcine species. **Biol Reprod**, v. 69, n 3, Sep, p. 1013-22. 2003.

MACHALKOVA, M.; KRAUSOVA, K.; JOSEKOVA, E.; TOMANEK, M. Developmental of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of

follicular wave on *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v.61, p. 329-335, 2004.

MACKAREVICH AV, MARKKULA M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor i during *in vitro* maturation and culture. **Biol Reprod.** v. 66 ,p. 386–92. 2002.

MAGNUSSON, O. et al. Simultaneous determination of dopamine, DOPAC and homovanilic acid. Direct injection of supernatants from brain tissue homogenates in a liquid chromatography—electrochemical detection system. **J. Chromatogr**, v. 221, n. 2, Dec 12, p. 237-47. 1980.

MAJERUS V, DE ROOVER R, ETIENNE D, KAIDI S, MASSIP A, DESSY F, DONNAY I. Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. **Theriogenology**, v.52, p.1169-1179. 1999.

MARQUANT-LE GUIENNE B., HUMBLLOT P.. Practical measures to improve *in vitro* blastocyst production in the bovine. **Theriogenology** ,v. 449, p.3-11. 1998.

MCNATTY, K. P. et al. Control of early ovarian follicular development. **J Reprod Fertil Suppl.** V.54, p.3-16. 1999.

MEMILI E, FIRST NL. Control of gene expression at the onset of bovine embryonic developmental. **Biol Reprod.**, 61:1198-1207. 1999.

MEIRELLES FV, CAETANO AR, WATANABE YF, RIPAMONTE SF, CARAMBULA GK, MERIGUE SM, GARCIA SM. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Anim. Reprod. Sci.**, 82-83:12-20. 2004.

MONTREZOR, L.H. Esteroidogênese em ovários bovinos: Estudo *in vitro* dos efeitos da endotelina-1, angiotensina-II e peptídeo natriurético atrial na dominância e atresia de células da granulosa produtoras de estradiol.. 2002.

Tese (Doutorado em Pós-Graduação) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

MOOR, R.M. et al. Oocyte maturation and embryonic failure. **Hum Reprod Update**, v.4, n.3, Mary-Jun, p.223-36. 1998.

MORR, R.M. et al. Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 40, p. 197-210. 1990

MUÑOZ M, RODRÍGUEZ A , Díez C , CAAMAÑO JN, FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ MT, PÉREZ-GÓMEZ A, DE FRUTOS C, FACAL N, GÓMEZ E. Tyrosine kinase A, C and fibroblast growth factor-2 receptors in bovine embryos cultured in vitro. 2009.

MURDOCH, W. J. Disruption of cellular associations within the granulosa compartment of periovulatory ovine follicles: relationship to maturation of the oocyte and regulation by prostaglandins. **Cell Tissue Res**. V. 252, n 2, May, p. 459-62. 1988.

NIEMANN, H, WRENZYCKI, 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.

ORSI NM, LEESE HJ. Amino acid metabolism of preimplantation bovine embryos cultured with bovine serum albumin or polyvinyl alcohol. **Theriogenology**. V.61, p.561-572. 2004.

OLAR, T.T., POTTS, A.S. Effect of fetal bovine serum of different gestational ages on mouse embryo growth and development. **J Assist Reprod Genet**, v.10, n 3, Apr, p. 236-8. 1993.

PALMA GA, TORTONESE DJ, SINOWATZ F. 2001. Developmental capacity *in vitro* of prepubertal oocytes. **Anat. Histol. Embryol.**, v. 30, p. 295-300. 2001.

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.

PAVLOK, A. et al. Simulation of intrafollicular conditions prevents GVBD in bovine oocytes: a better alternative to affect their developmental capacity after two-step culture. **Mol Reprod Dev**, v.17, n2, Jun, p.197-208. 2005.

PETERSON AJ, LEE RS.. Improving successful pregnancies after embryo transfer. **Theriogenology**, v. 59, p.687-697. 2003.

PINCTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Mol. and Cellular Endocrinology**, 145: 27-37,1998.

PINYOPUMMINTR T, BAVISTER BD. *In vitromatured/ in vitro*-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, proteinfree culture media. **Biol Reprod**. V.45, p.736-742. 1991.

PINYOPUMMINTR T, BAVISTER BD.. Effects of amino acids on development *in vitro* of cleavage-stage bovine embryos into blastocysts. **Reprod Fertil Dev**, v. 8, p. 835-841. 1996.

PRESICCE GA, JIANG S, SIMKIN M, ZHANG L, LOONEY CR, GODKE RA, YANG X. Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. **Biol Reprod**, v. 56, p.386-392. 1997.

RICHARD, F.J.; SIRARD, M.A. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation *in vitro*. **Biology of Reproduction**, 54: 22-28, 1996a.

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.

RIZOS D, WARD F, DUFFY P, BOLAND M, LONERGAN P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Mol. Reprod. Dev**, v.61, p.234-248, 2002b.

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.

RODRIGUEZ KF, BLOMBERG LA, ZULEKE KA, MILES JR, ALEXANDER JE, FARIN CE. Identification of candidate mRNAs associated with ponadotropin-induced maturation in murine cumulus oocyte complexes using serial analysis of gene expression. **Physiol Genomics**, v.27, p.318-327, 2007.

ROSE, T.A. BAVISTER, B.D. Effects of oocyte maturation medium on *in vitro* development of *in vitro* fertilized bovine embryos. **Mol Reprod Dev**, v. 31, n 1, Jan, p. 72-7. 1992.

RUSSEL, DF, BAQIR, S, BORDIGNON, J, BETTS, DH. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. **Molecular Reproduction and Development** ,73:1255-1270. 2006.

SAGIRKAYA H, MISIRLIOGLU M, KAYA A, FIRST NL, PARRISH JJ, MEMILI E. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. **Animal Reproduction Science**, v.101, p. 225-240, 2007.

SALVESEN, G. S.; DIXIT, V.M. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. **Cell**, v. 91, n 4, Nov14, p. 443-6. 1997.

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.

SIRARD MA. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, p.1241-1254, 2001.

SIRARD, M.A.; COENEN, K.; BILODEAU, S. Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 37, p. 39-55, 1992.

SIRARD, M.A.; PARRISH, J.J.???; WARE, C.B.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; FIRST, N.L. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. **Biol. Reprod.**, 39: 546-552, 1998.

SIRARD, M.A.; COENEN, K. The co-culture of cumulus-enclosed bovine oocytes and hemisections of follicles: effects on meiotic resumption. **Theriogenology**, v. 40, p.933-942, 1993.

SIRARD, M.A.; DESROSIER, S.; ASSIDI, M. *In vivo* and *in vitro* effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. **Theriogenology**, 68: 71-76, 2007.

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.

SPICER, A. P. et al. Molecular cloning and characterization of a putative mouse hyaluronan synthase. **J Biol Chem**, v. 271, n 38, Sep 20, p. 23400-4. 1996

SU YQ, RUBINSTEIN S, LURIA A, LAX Y, BREITBART H. Involvement of MEK-mitogenactivated protein kinase pathway in follicle-stimulating hormone-

induced but not spontaneous meiotic resumption of mouse oocytes. **Biol Reprod**, v.56, p.358-365, 2001.

TAMASSIA M, HEYMAN Y, LAVERGNE Y, RICHARD C, GELIN V, RENARD JP, CHASTANT-MAILLARD S. Evidence of oocyte donor cow effect over oocyte production and embryo development *in vitro*. **Reproductin** v.126, p. 629-637. 2003.

TATEMOTO, H.; TERADA, T. Time-dependent effects of cycloheximide and α -amanitin on meiotic resumption and progression in bovine follicular oocytes. **Theriogenology**, 43:1107-1113,2000.

THOMAS, R. E. et al. Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during *in vitro* maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels. **Biol Reprod**, v 70, n 3, Mar, p. 548-56, 2004.

THOMPSON JG.. Comparison between *in vivo* derived and *in vitro*-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. **Reprod Fert Dev**. V. 9, p.341-354. 1997.

THOMPSON, J. G. The impact of nutrition of the cumulus oocyte complex and embryo on subsequent development in ruminants. **J Reprod Dev**, v.52, n.1, Feb, p.169-75. 2006.

TSAFRIRI, A.; POMERANTZ, S.H. Regulation of the development of meiotic competence and of the resumption of oocyte maturation in the rat. **Symp. Soc. Exp. Biol.**, v. 38, p. 25-43, 1984.

VANROOSE G, VAN SOOM A, DE KRUIF A. From co-culture to defined medium: state of the art and practical considerations. **Reprod Domest Anim**, v. 36, p.25-28. 2001.

VIGNERON, C.; PERREAU, C.; DALBIÉS-TRAN; JOLY, C.; HUMBLLOT, P.; UZBEKOVA, S.; MERMILLOD, P. Protein synthesis and mRNA storage in cattle oocytes maintained under meiotic block by roscovitine inhibition of MPF activity, **Mol. Reprod. Dev** 69: 457–465, 2004.

VIREQUE, A. A.; CAMARGO, L.S.; SERAPIAO, R. V.; ROSA E SILVA, A. A.M.; Watanabe, Y.F.; Ferreira, E.M.; Martins, W.P.; FERRIANI, R.A. Preimplantation development and expression of hsp-70 and bax genes in bovine blastocysts derived from oocytes matured in alpha-MEM supplemented with growth factors and synthetic macromolecules. **Theriogenology**, v.71, p. 620-627, 2009.

VIREQUE, A. A. ; SA, V. F. ; J.H.M, V. ; L.S., C. ; M.V.B.SILVA, ; ROSA E SILVA, A. A. M. . Estradiol 17 Produces Granulosa Cells Inhibit Meiosis Resumption of Bovine Oocytes Under Chemically Defined Conditions. In: SBFis/ALACF, 2003, Ribeirão Preto. Resumos **ALACF**, p. 364. 2003.

VIUFF, D. et al. Chromosomal abnormalities and developmental kinetics in vivo – developed cattle embryos at days 2 to 5 after ovulation. **Biol Reprod.** v. 65, n1 Jul, p. 204-8. 2001.

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.

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.

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

WRENZYCKI, C.A. L. et al. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. **Theriogenology**, v. 68S, p. S77–S83, 2007.

WU D, CHEUNG QCK, WEN L, LI J. A growth-maturation system that enhances the meiotic and developmental competence of porcine oocytes isolated from small follicles. **Biol Reprod**, v.75, p.547-554, 2007.

YANG, M. Y., 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, n 3, Apr 15, p.159-69. 2002.

YUAN YQ, VAN SOOM A, COOPMAN FOJ, MINTIENS K, BOERJAN ML, VAN ZEVEEREN A, KRUIF A, PEELMAN LJ. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured in vitro. **Theriogenology**, v. 59, p. 1585-1596, 2003.

ZHANG M, XIA G, ZHOU B, WANG C. Gonadotropin-controlled mammal oocyte meiotic resumption. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p.282-296, 2007b.