



**Universidade Estadual do Ceará**  
**Faculdade de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**

**Maria Luciana Lira de Andrade**

**IDENTIFICAÇÃO DO CD44, UM RECEPTOR PARA ÁCIDO  
HIALURÔNICO, EM OÓCITOS E EMBRIÕES CAPRINOS**  
**(*Capra hircus*)**

**Fortaleza – Ceará**

**Julho – 2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Universidade Estadual do Ceará**  
**Faculdade de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**

**Maria Luciana Lira de Andrade**

**IDENTIFICAÇÃO DO CD44, UM RECEPTOR PARA ÁCIDO  
HIALURÔNICO, EM OÓCITOS E EMBRIÕES CAPRINOS**  
**(*Capra hircus*)**

**Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado  
do Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Veterinárias da Faculdade de Veterinária da  
Universidade Estadual do Ceará, como requisito  
parcial para a obtenção do grau de Mestre em  
Ciências Veterinárias.**

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade  
Animal.

Orientador: Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo  
Freitas.

**Fortaleza – Ceará**

**Julho – 2007**

A453i, Andrade, Maria Luciana Lira de  
Identificação do CD44, um receptor para ácido  
hialurônico, em oócitos e embriões caprinos  
(*Capra hircus*).\_ Fortaleza, 2007.  
75 p.; il.  
Orientador: Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas  
Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) –  
Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.  
1. Caprinos 2. Embriões 3. Ácido hialurônico 4. CD44  
Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD:636.39

**Universidade Estadual do Ceará**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**

**Título do trabalho:** Identificação do CD44, um receptor para ácido hialurônico, em oócitos e embriões caprinos (*Capra hircus*)

**Autor:** Maria Luciana Lira de Andrade

Defesa em: 20/07/2007

Conceito obtido:    satisfatório   

Nota obtida:    10,00   

**Banca Examinadora:**

---

Vicente José de Figueirêdo Freitas, Prof. Dr.

Orientador

---

Dárcio Ítalo Alves Teixeira, Prof. Dr.

Examinador / Co-orientador

---

José Luiz Rodrigues, Prof. Dr.

Examinador

---

Lúcia Daniel Machado da Silva, Profa. Dra.

Examinadora (Suplente)

Fui Pixote, sei andar na escuridão enfrentar moinho, derrubar dragão  
Cavaleiro andante, Dom Quixote não tem medo de alucinação.  
Gabriel o Pensador

*Ao maior exemplo de vitória e de vida: Benedito Andrade,  
Ao maior exemplo de proteção e renúncia: Luzia Andrade.  
Ao maior exemplo de inteligência e amizade: Lúcia Andrade,  
Ao maior exemplo de profissional e amor: Lopes Júnior.  
Dedico.*

## **AGRADECIMENTOS FOMAIS**

Agradeço formalmente às seguintes instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo financiamento deste projeto de pesquisa.
- Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Funcap, pelo auxílio através da bolsa de mestrado.
- Universidade Estadual do Ceará – UECE, pelas instalações cedidas na realização deste trabalho.
- Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – PPGCV, pela realização do curso de mestrado.
- Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução – LFCR, pelas instalações e equipamentos cedidos para a realização dos experimentos.
- Laboratório de Genética Molecular – LABGEM, localizada na Universidade Federal do Ceará, pela realização da etapa de imunohistoquímica deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS PESSOAIS**

Agradeço a Deus e é Dele a vitória alcançada em minha vida.

Agradeço a meu pai, Benedito Ferreira de Andrade, pelo amor, o maior exemplo de vida e de conquista. Por me mostrar as coisas boas da vida e por me ensinar a enfrentar o mundo com garra. Mais do que um pai, o maior ídolo que um filho pode ter.

À Maria Lira de Andrade, mãe de sangue, pelas palavras que a senhora não pôde me dizer, pelo carinho que não pôde me dar e pelo amor e proteção que eu sempre senti vindo da senhora junto a Deus.

À Luzia Ferreira de Andrade, mãe de coração, pelo cuidado, amor, dedicação e, acima de tudo, pela FORÇA que a senhora vêm me dando durante esses últimos dois anos, mesmo estando em um plano mais elevado. Serei eternamente grata por tudo que a senhora fez e continua fazendo por mim.

À Maria Lúcia Lira de Andrade, mais do que irmã, minha alma gêmea. Pelo amor incondicional, por ser meu motivo de existir a cada dia e por me ensinar a ter força sempre!

À Edilson Soares Lopes Júnior, meu grande amor, por ter me ajudado a entrar, a permanecer e a terminar o mestrado. Por me fazer acreditar no amor e no destino. Obrigada por me fazer muito feliz do seu lado.

À minha grande família: meus amados irmãos Yara Lira, Yon Lira, Yoná Lira e Benedito Júnior, aos meus lindos sobrinhos Alan Victor e Gino Júnior, e meus queridos cunhados André Igor, Érika Dávila e Fernanda Larissa por todo carinho e amor.



À minha prima-irmã Laine Cristina, pela dedicação, apoio e amor que me ajudou a sobressair em todas as dificuldades e por me dar a certeza de que eu nunca estarei sozinha.

À minha filha Laila, por me mostrar que a vida continua e por me trazer a felicidade plena e cultivar o mais distinto sentimento de amor.

Ao Prof. Dr. Vicente José de Figueiredo Freitas, que mais do que um orientador, é um pouco de pai e amigo. Muito obrigada por ter apostado em mim e acreditado no meu trabalho. Muito obrigada por me dar a oportunidade de amadurecer e por ter me ensinado não somente conceitos de reprodução, mas por me ensinar os conceitos de honestidade e de caráter, por me mostrar que um grande pesquisador pode sim ser alegre e divertido e fazer os nossos dias de trabalho mais prazerosos. Além de agradecer, eu o parabeno por fazer do Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR) uma grande família.

Ao Prof. Dárcio Ítalo Alves Teixeira pela co-orientação, convívio diário e grande amizade durante estes dois anos.

Aos professores Prof. Dr. José Luiz Rodrigues e a Profa. Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva, pelas sugestões e colaboração visando a melhoria deste trabalho.

À minha segunda família, Sthênia Amora, Viviane Saraiva e Mariana Matos, por terem me adotado, terem me amado muito e terem cuidado de mim todos os dias que estivemos juntas. Vocês me fizeram muito feliz e estarão para sempre no meu coração.

Ao meu grande amigo JB Cajazeiras, por ter me ensinado muito, por ter me acompanhado sempre e por ter se tornado meu GRANDE AMIGO.

À Juliana Luz e Agostinho Neto, por terem realizado este trabalho com muito carinho e acima de tudo muita amizade. Obrigada por me darem a oportunidade de conhecer pessoas tão maravilhosas e de um coração enorme, como vocês.

À Luciana Melo pelo apoio e por sua importante colaboração com seus ensinamentos e ajuda na realização deste trabalho.

À Mário Faria, por ter se disponibilizado a me ajudar e ensinar toda a parte de imunofluorescência e imunohistoquímica realizada neste trabalho.

À Francisco Carlos e Raylene Maria pelo companheirismo e amizade conquistada, por se tornarem tão especiais e importantes na minha vida.

À Elizabeth Saraiva, Suely Renata e Karlliely Almeida, por me darem forças e muito carinho no momento mais difícil do mestrado. A vocês, meus sinceros agradecimentos.

À minha terceira família, a equipe do LFCR: Daniel Holanda, Alessandra Fernandes, Lécio Almeida, Suyanne Cruz, Liliane Rafael, Renan Aragão, Cíntia Braga, Selmar Alves, Cesar Camelo. Pelos momentos de descontração, pelos momentos de reunião, pelos experimentos executados, pelo companheirismo e por todo aprendizado que tivemos juntos.

## RESUMO

Durante os últimos anos, tem-se estudado a técnica de produção *in vitro* de embriões (PIV) visando seu aprimoramento e aplicação na reprodução. Neste sentido, estudos mais detalhados sobre os glicosaminoglicanos (GAGs) têm sido propostos, uma vez que sabe-se da sua importância no incremento da PIV. Dentre eles, destaca-se o ácido hialurônico (AH), o qual tem sido adicionado aos meios de cultivo, aumentando a produção de blastocistos. É sabido que o AH atua através da interação com o CD44, seu principal receptor de membrana presente em oócitos e embriões de bovinos, suínos e humanos, porém ainda não estudado em caprinos. O presente trabalho objetivou identificar o CD44 em oócitos imaturos, maturados e embriões da espécie caprina no estágio inicial de desenvolvimento. Primeiramente, foi padronizada uma metodologia utilizando dois anticorpos monoclonais anti-humano para identificar CD44 em linfócitos humanos e caprinos, além de oócitos imaturos caprinos. Neste estudo, foi identificado o receptor CD44 nas células analisadas. A metodologia previamente estabelecida foi aplicada em oócitos e embriões caprinos, utilizando o anticorpo A3D8. Assim, nesta segunda abordagem, verificou-se marcação em oócitos imaturos, maturados e embriões em estágio pró-nuclear, de duas, quatro e oito células de caprinos. Finalmente, podemos concluir que oócitos imaturos, maturados e embriões precoces da espécie caprina, expressam o CD44. Este achado apresenta como perspectiva o uso do AH em meios de PIV caprina para melhorar o sucesso da mesma.

## ABSTRACT

During the last years, the technique of *in vitro* production (IVP) of embryos has been studied aiming its improvement and application in the reproduction. Thus, detailed studies on the glycosaminoglicans (GAGs) have been considered, a time that is known its importance in the PIV increase. Amongst them the hyaluronic acid (HA) is distinguished which has been added the culture medium, increasing the blastocyst rate. It is known that AH acts through the interaction with the CD44, its main membrane receptor, which is present in both oocytes and embryos of bovine, porcine and human. However, CD44 was not yet studied in goats. This study was carried out to investigate whether CD44 on goat immature, mature oocytes and early stage of development embryos. Firstly, a protocol was developed using two anti-human monoclonal antibodies in order to identify the CD44 in human and goat lymphocytes, as well as in goat oocytes. In this study, CD44 was identified in all analyzed cells. The protocol previously tested was used in both goat oocytes and embryos, using the A3D8 antibody. Thus, in this second approach, it was verified the staining in immature and matured oocytes as well as in pronuclear, 2-, 4- and 8 stage embryos. Finally, we can conclude that goat immature oocytes, matured oocytes and early embryos express CD44. This finding presents as perspective the use of AH in culture media to increase the success of goat PIV.

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e/ou símbolos.....	12
Lista de figuras e tabelas .....	15
Introdução .....	19
1. Revisão de Literatura.....	20
1.1. Desenvolvimento inicial e metabolismo embrionário.....	20
1.2. Produção <i>in vivo</i> de embriões caprinos.....	23
1.3. Produção <i>in vitro</i> de embriões caprinos.....	24
1.3.1. Colheita de oócitos.....	25
1.3.2. Maturação <i>in vitro</i> .....	25
1.3.3. Fecundação <i>in vitro</i> .....	27
1.3.4. Cultivo <i>in vitro</i> .....	28
1.4. Glicosaminoglicanos.....	29
1.4.1. Ácido Hialurônico.....	31
1.4.2. CD44.....	34
1.4.2.1. Estrutura.....	34
1.4.2.2. Função.....	35
Justificativa .....	39
Hipótese Científica .....	40
Objetivos.....	40
Geral .....	40
Específicos .....	40
Capítulo 1: Anti-human CD44 antibodies are applicable in immunohistochemical and immunofluorescence detection in both goat lymphocytes and oocytes.....	41
Capítulo 2: Identification of CD44 (hyaluronic acid receptor) in goat oocytes and early stage embryos.....	49
Conclusão .....	64
Perspectivas .....	64
Referências bibliográficas.....	65
Anexos.....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SÍMBOLOS

- AH = Ácido Hialurônico
- ATP = Adenosina Trifosfato
- BSA = Bovine Serum Albumin (Albumina Sérica Bovina)
- CC = Células do *cumulus*
- CCO = Complexo *cumulus*-oócito
- CIDR = Controlled Internal Device Release (Dispositivo Interno de Liberação Controlada)
- CLs = Corpos Lúteos
- CP = Corpúsculo Polar
- DNA = Ácido Desoxiribonucléico
- DPBS = Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Solução Salina Fosfato-Tamponada de Dulbecco)
- eCG = Equine Chorionic Gonadotrophin (Gonadotrofina Coriônica Equina)
- EGF = Epidermal Growth Factor (Fator de Crescimento Epidermal)
- FGA = Fluorogestone Acetate (Acetato de Fluorogestona)
- FIV = Fecundação *in vitro*
- FSH = Follicle Stimulating Hormone (Hormônio Folículo Estimulante)
- g = gravidade
- GAG = Glicosaminoglicano
- GC = Grânulos Corticais
- GnRH = Gonadotrophin Releasing Hormone (Hormônio Liberador de Gonadotrofina)
- GVBD = Germinal Vesicle Breakdown (Vesícula Germinativa Rompida)
- h = hora
- HAS = Hyaluronic Acid Synthetase (Ácido Hialurônico Sintetase)
- IA = Inseminação Artificial
- IBGE = Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

- ICSI = Intra-Cytoplasmic Sperm Injection (Injeção intracitoplasmática de Espermatozóides)
- IGF-1 = Insulin Growth Factor-1 (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1)
- LH = Luteinizing Hormone (Hormônio luteinizante)
- $\mu\text{g}$  = Microgramas
- $\mu\text{L}$  = Microlitros
- MAP = Medroxiprogesterone acetate (acetato de medroxiprogesterona)
- mg = Miligramas
- MII = Metáfase II
- min = Minutos
- MIV = Maturação *in vitro*
- mL = Mililitro
- MOTE = Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões
- MP = Membrana Plasmática
- NaCl = cloreto de sódio
- ng = Nanogramas
- PBS = Phosphate Buffered Saline (Solução Salina Fosfato-Tamponada)
- pFSH = Porcine Follicle Stimulating Hormone (Hormônio Folículo Estimulante Suíno)
- $\text{PGE}_1$  = Prostaglandina  $\text{E}_1$
- $\text{PGF}_{2\alpha}$  = Prostaglandina  $\text{F}_{2\alpha}$
- PIV = Produção *in vitro*
- PZ = Presumível Zigoto
- RHAMM = Receptor for Hyaluronic Acid Mediated Motility (Receptor para Ácido Hialurônico Mediador da Motilidade)
- RNA = Ácido Ribonucléico
- RT-PCR = Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia de Polimerase com Transcrição Reversa)
- SCE = Soro de Cabra em Estro

- SFB = Soro Fetal Bovino
- SOE = Soro de Ovelha em Estro
- SOF = Sintetic Oviduct Fluid (Fluido Sintético de Oviduto)
- SRD = Sem Raça Definida
- TCM-199 = Tissue Culture Medium 199 (Meio de Cultivo Tecidual 199)

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### 1. *Lista de Figuras*

#### 1.1. *Revisão de Literatura*

- Figura 1 – Esquema de fecundação em mamíferos. (A) Células espermáticas são ativadas no trato reprodutivo da fêmea durante o processo de capacitação. (B) Espermatozoides capacitados apresentam hipermotilidade e estão aptos a ligar-se à zona pelúcida (2). (C) A ligação entre o espermatozóide e a zona pelúcida desencadeia a reação acrossômica e as enzimas são secretadas. (D) Após a liberação das enzimas



- Figura 5 – Efeito de glicosaminoglicanos (ácido hialurônico, sulfato de dermatan, sulfato de condroitina e heparina) sobre o a taxa de blastocistos de embriões suínos cultivados *in vitro*.....31
- Figura 6 – Molécula de ácido hialurônico formada por unidades alternadas de ácido glicurônico e N-acetilglicosamina (A). Ácido hialurônico associado com outros GAGs e com proteínas que constituem os proteoglicanos (B).....32
- Figura 7 – Determinação, por citometria de fluxo, do efeito de cultivo com AH sobre a incidência de apoptose em células da granulosa.....33
- Figura 8 – (A) Organização genômica do CD44, onde cada quadrado representa um éxon. (B) Formas variantes de decodificação do CD44. (C) Representação gráfica da molécula de CD44. Sua estrutura é dividida em três domínios: citoplasmático (encontrado no interior do citoplasma), transmembranário (inserido entre a bicamada fosfolipídica) e extracelular (onde se localiza o sítio de ligação ao AH, encontrada na matriz extracelular). As caixas brancas representam 10 exons variantes (v1-v10), os quais estão inseridos dentro do domínio extracelular e, de acordo com suas combinações, formam várias isoformas do CD44.....35
- Figura 9 – Comparação de seqüências de aminoácidos do domínio citoplasmático e transmembrana do CD44 em 13 espécies. Legenda das espécies: 1 – humano, 2 – babuíno, 3 – camundongo, 4 – rato, 5 – hamster chinês, 6 – hamster golden, 7 – canino, 8 – bovino, 9 – eqüino, 10 – caprino, 11 – rinoceronte, 12 – galinha, 13 – pato. ....36

1.84924(.)-5.80946(.)4.84924(.)Figura 10 – Efeito da paço de CD44 na sobrevivência de embriões suínos cultivados *in vitro*.....37

## **1.2. Capítulo 1**

- Figura 1 – Immunohistochemical (A and B) and immunofluorescent (C and D) detection of CD44 receptor on human (A and C) and goat (B and D) lymphocytes using anti-human monoclonal antibody (DF1485 clone).....45
- Figura 2 – Immunohistochemical (A, B and C) and immunofluorescent (D, E and F) methods for CD44 receptor detection on goat immature oocytes using A3D8 (B and E) or DF1485 (C and F) anti-human monoclonal antibodies. In A and D, primary antibody was omitted as the negative control. The immature condition of oocytes was confirmed by germinal vesicle visualization in all fluorescent stained oocytes (G, H and I).....46

## **1.3. Capítulo 2**

- Figura 1 – Goat early embryos recovered by oviductal flushing and cultured for 36 hours (magnification: 200x).....58
- Figura 2 – Immunofluorescence staining showing CD44 receptor in goat oocytes: negative control (A), immature oocyte (B) and matured oocyte (C). The confirmation of the respective nuclear maturation stage is showed in the second row (D, E and F) by Hoechst staining (magnification: 600x).....58
- Figura 3 – Immunofluorescence staining showing CD44 receptor in goat early embryos: pronuclear embryo (A), 2-cell-stage embryo (B), 4-cell-stage embryo (C), and 8-cell-stage embryo (D). The confirmation of the respective embryo development stage is showed in the second row (E, F, G and H) by Hoechst staining (magnification: 600x).....59

## **2. Lista de Quadros**

### **2.1. Revisão de Literatura**

- Quadro 1 – Desenvolvimento *in vitro* de embriões caprinos após a MIV na presença (Vitaminas) ou ausência (Controle) de suplementação vitamínica.....26
- Quadro 2 – Desenvolvimento *in vivo* de embriões bovinos oriundos de CCOs transferidos para o oviduto e posteriormente inseminados, embriões de 4- e 8- células produzidos *in vitro*, comparado com o desenvolvimento de embriões maturados, fecundados e cultivados *in vitro*.....29
- Quadro 3 – Principais glicosaminoglicanos e suas unidades dissacarídicas repetitivas.....30
- Quadro 4 – Análise de padrões de ploidia em embriões suínos de quatro células produzidos por FIV, ICSI e ICSI-AH.....33
- Quadro 5 – Efeito de diferentes concentrações de anticorpo anti-CD44 sobre a maturação de oócitos suínos.....38

## INTRODUÇÃO

A criação de pequenos ruminantes, sobretudo da espécie caprina, na região Nordeste do Brasil é de extrema importância econômica, já que a exploração destes animais nessa região cresceu bastante, tanto do ponto de vista quantitativo, quanto qualitativo. Dentre outros aspectos, a exploração de caprinos no Nordeste brasileiro destaca-se pelo seu efetivo, o qual consta de, aproximadamente, 10,4 milhões de animais, o que corresponde a 88% do rebanho nacional (IBGE, 2007). Este rebanho é composto, em sua maioria, por animais sem raça definida (SRD) ou locais, os quais são caracterizados por uma elevada adaptabilidade às condições ambientais, porém apresentam baixos níveis produtivos (Oliveira & Lima, 1994).

A fim de melhorar a produtividade do rebanho caprino, principalmente para a produção de leite, criadores têm utilizado raças exóticas, tais como: Anglo-Nubiana, Pardo-Alpina e Saanen. Estas, assim como outras raças criadas no Nordeste, têm sido exploradas em associação com o uso de ferramentas de maximização da produtividade, dentre as quais destacam-se as biotécnicas da reprodução: inseminação artificial (IA) e múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE).

Atualmente, a produção *in vitro* (PIV) de embriões surge, dentre as biotécnicas da reprodução, como uma nova alternativa para multiplicar, de forma rápida, as características de animais geneticamente superiores. No entanto, na espécie caprina, os resultados com esta técnica ainda estão aquém daqueles obtidos em outras espécies, como, por exemplo, a bovina (Izquierdo *et al.*, 2002; Cognié *et al.*, 2003). Isto pode ser devido a particularidades na dinâmica da maturação oocitária, bem como ao desenvolvimento inicial do embrião caprino e, conseqüentemente, à necessidade de meios específicos para cada etapa da PIV. Alguns laboratórios têm buscado superar as dificuldades, utilizando meios com componentes alternativos, como os glicosaminoglicanos (GAGs), os quais podem ser vantajosos nas diversas etapas da PIV (Kaneko *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2005; Thérien *et al.*, 2005). Dentre os GAGs comumente utilizados, podemos destacar o ácido hialurônico (AH), cujos efeitos benéficos sobre a fecundação e desenvolvimento embrionário têm sido verificados em bovinos e suínos (Furnus *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2005; Toyokawa *et al.*, 2005). O papel fisiológico do AH é mediado pelo CD44 que é o seu principal receptor de superfície celular (Afify *et al.*, 2006). Neste contexto, vários laboratórios têm proposto o estudo de receptores específicos visando melhor compreensão de sua atuação, bem como dos caminhos metabólicos que estes componentes realizam.

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

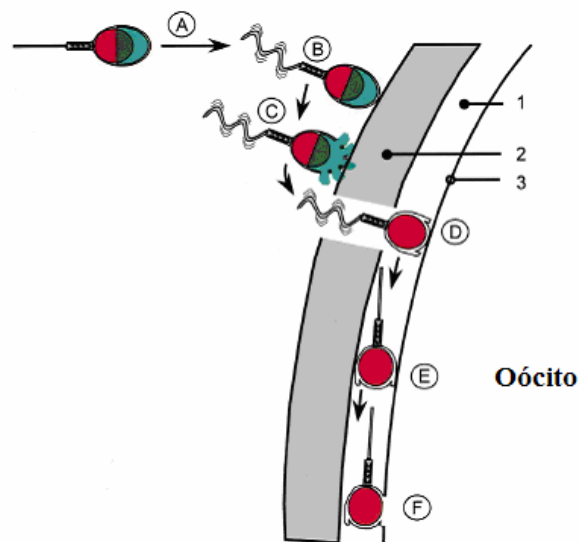
### 1.1. Desenvolvimento inicial e metabolismo embrionário

A fecundação consiste na fusão do gameta feminino (oócito) com o gameta masculino (espermatozóide). Este último forma o sêmen, juntamente com o plasma seminal, o qual se trata de uma suspensão celular líquida resultante de secreções dos órgãos acessórios do trato genital masculino (Hafez & Hafez, 2004). Os espermatozoides depositados no trato genital feminino necessitam ser transportados até a ampola para interagir com os oócitos, os quais se encontram nesse mesmo ambiente. Além disso, estes espermatozoides necessitam de um prévio período para as modificações bioquímicas e estruturais que os capacitem a fecundar os gametas femininos. Esse processo é conhecido como capacitação, onde ocorre a remoção ou modificação de componentes da superfície do espermatozóide através de secreções encontradas no trato reprodutivo da fêmea (Hafez & Hafez, 2004).

Tão importante quanto às alterações sofridas pelos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea, a maturação oocitária é primordial para o processo de fecundação. Antecedendo este processo, os oócitos passam por mudanças nucleares e citoplasmáticas, incluindo quebra da vesícula germinativa (GVBD), condensação dos cromossomos e extrusão do 1º corpúsculo polar (CP). Essas mudanças estruturais estão associadas a alterações na distribuição dos microtúbulos e microfilamentos. A organização desses componentes do citoesqueleto tem importância fundamental na regulação da formação do fuso meiótico, alinhamento e segregação dos cromossomos (Li *et al.*, 2005). Em casos destes componentes se tornarem desorganizados, pode ocorrer a perda da atividade dos cromossomos da placa metafásica, observando-se também a migração gradual dos grânulos corticais (GC) da superfície do oócito (Hunter, 1989), além da formação assíncrona dos pronúcleos, prejudicando a formação do embrião (Armstrong, 2001). Em um estudo com oócitos de cabras pré-púberes, Velilla *et al.* (2005) observaram que em oócitos em metáfase II (MII), os microtúbulos se encontram circundando o fuso meiótico e o corpúsculo polar, não sendo verificada uma distribuição definida. Já com relação aos microfilamentos, estas estruturas estão organizadas na região cortical e envolvem o fuso meiótico nos zigotos, além de se encontrarem no interior no corpúsculo polar em oócitos maturados.

Após os processos de capacitação espermática e maturação oocitária, o passo seguinte é a fecundação (Figura 1), onde se faz necessário uma população de espermatozoides móveis que penetrem o oócito através da zona pelúcida. Essa etapa ocorre mediante a reação acrossômica, a qual se trata de um processo caracterizado pela fusão das membranas

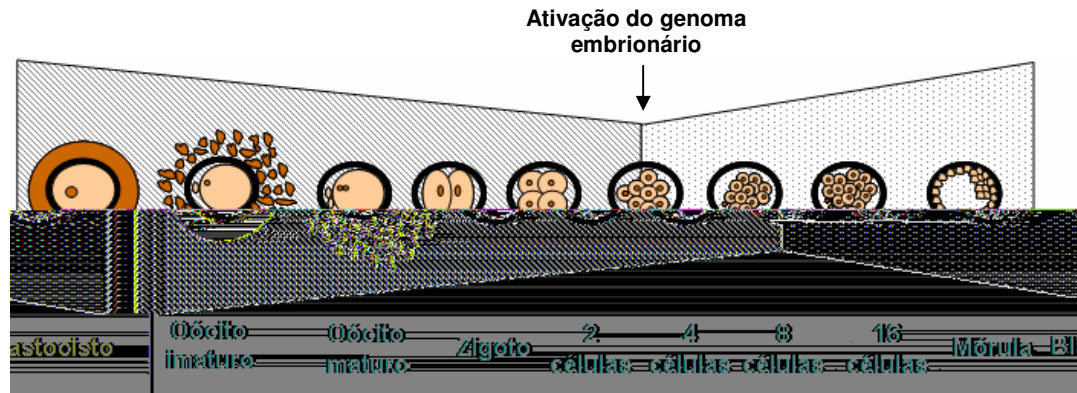
acrossômica e plasmática da célula (Yanagimachi & Usui, 1974). Segundo Somanath *et al.* (2000), a progesterona, produzida no fluido folicular e pelas células do *cumulus*, também induz a reação acrossômica, quando, logo após a liberação das enzimas hidrolíticas, ocorre a penetração dos espermatozóides nas células do *cumulus* até atingirem a zona pelúcida. Yanagimachi (1994) verificou que a glicoproteína ZP3 (constituente da zona pelúcida) é responsável pela ativação da reação acrossômica.



**Figura 1.** Esquema de fecundação em mamíferos. (A) Células espermáticas são ativadas no trato reprodutivo da fêmea durante o processo de capacitação. (B) Espermatozóides capacitados apresentam hipermotilidade e estão aptos a ligar-se à zona pelúcida (2). (C) A ligação entre o espermatozóide e a zona pelúcida desencadeia a reação acrossômica e as enzimas são secretadas. (D) Após a liberação das enzimas acrossômicas, o espermatozóide penetra na zona pelúcida. (E) O espermatozóide sem acrossoma migra para o espaço perivitelínico (1). (F) A membrana presente na cabeça do espermatozóide se funde com a membrana vitelínica (3) e a célula espermática é incorporada ao oócito. Fonte: Yanagimachi (1994).

Subseqüente à fecundação, ocorre a retomada da meiose, sendo esta caracterizada pela segregação cromossômica para os pólos do fuso e extrusão do segundo corpúsculo polar contendo metade dos cromossomos do oócito (Ibáñez *et al.*, 2003). O potencial de desenvolvimento embrionário está associado à presença de RNAs mensageiros e proteínas, acumulados pelo oócito durante a oogênese, cuja principal função é manter o embrião durante os primeiros ciclos celulares até o momento da ativação do seu próprio genoma (Figura 2) (Gutierrez-Adan *et al.*, 2004). No momento da ativação, pode ocorrer o bloqueio do desenvolvimento embrionário, o qual é gerado pela exaustão de reservas maternas de RNAm e

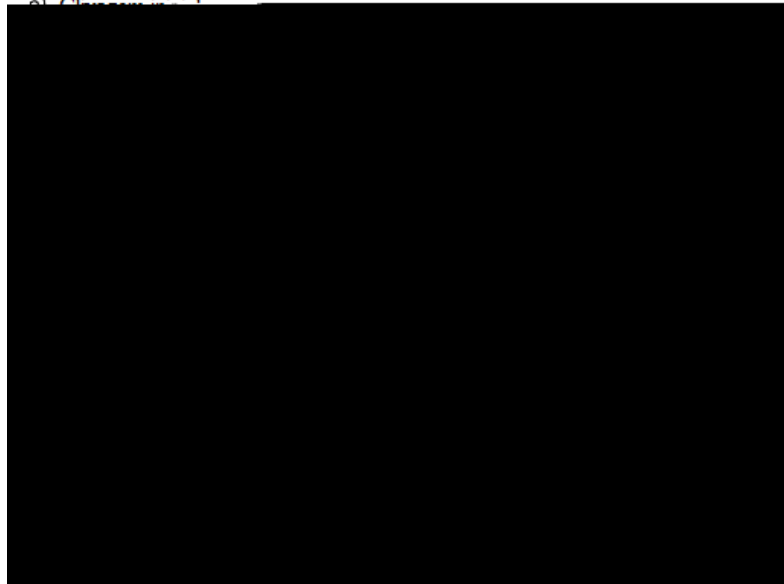
proteínas, levando à ausência de informações importantes para a manutenção do desenvolvimento ou início da ativação do genoma (Qui *et al.*, 2003).



**Figura 2.** Utilização do estoque de RNAs e proteínas maternos, ativação do genoma embrionário e utilização de RNAs e proteínas embrionárias. Os oócitos imaturos e maturados, zigotos e embriões de 2-, 4- e 8 células, utilizam RNAs e proteínas maternos sintetizados durante a oogênese, estas reservas tendem a diminuir com o desenvolvimento do embrião (caixa tracejada). Ainda no estágio de 8 células, ocorre a ativação do genoma embrionário e o início do consumo de proteínas sintetizadas por estes, que aumenta de acordo com o avanço do estágio embrionário (caixa pontilhada).

Fonte: Qui *et al.* (2003).

No que se refere ao consumo metabólico durante o início do desenvolvimento, os embriões são limitados quanto à utilização de glicose, sendo, dessa forma, mais utilizados os substratos energéticos como: piruvato, lactato e aminoácidos (Kim *et al.*, 1993). Posteriormente, o metabolismo é caracterizado pelo aumento do uso da glicose e glutamina. As mudanças fisiológicas no metabolismo de oócitos e embriões podem estar associadas com o aumento na demanda energética e/ou biossíntese, mas também com modificações no ambiente embrionário. Khurana & Niemann (2000) verificaram na espécie bovina, que a atividade metabólica é, aproximadamente, constante de oócitos imaturos até embriões no estágio de 12 células, sendo o piruvato o principal substrato energético. Já o consumo da glicose aumenta gradualmente de oócitos maturados até o estágio de blastocisto, principalmente entre o estágio de 12 a 16 células. A Figura 3 representa a contribuição da glicólise e fosforilação oxidativa para a produção de ATP em estágio de pós-compactação de embriões. A glicólise produz glicose 6-fosfato que atua na formação de riboses necessárias para a síntese de DNA e RNA, além de glicerol 3-fosfato para a síntese de fosfolipídeos, os quais são essenciais para o desenvolvimento embrionário. Já a glicosaminólise libera átomos de carbono e nitrogênio para a biossíntese de purinas e pirimidinas (Leese, 1993).



**Figura 3.** Representação simples das diferenças na via metabólica de ácidos carboxílicos e glicose entre clivagem inicial (a) e compactação e blastulação (b) em embriões ovinos. Durante a clivagem inicial, o consumo de glicose é baixo (linha fina), onde a produção de piruvato e lactato é o combustível para o ciclo de Krebs. Em geral, a taxa de produção de ATP é menor no esquema (a), onde a demanda não é elevada. Em contrapartida, a demanda de ATP aumenta com o processo de compactação e blastulação (linha grossa). A contribuição para a produção de ATP pela glicólise também aumenta com o desenvolvimento, causando um significativo aumento no consumo de glicose.

Fonte: Thompson (2000).

### **1.2. Produção *in vivo* de embriões caprinos**

A produção *in vivo* de embriões proporciona a obtenção de um maior número de embriões por fêmea doadora. O uso desta biotécnica é de enorme importância nos programas de melhoramento animal.

A sincronização ou a indução do estro permite obter embriões no mesmo estágio de desenvolvimento (Baril *et al.*, 1995), sendo possível utilizar estas estruturas para realização de outras biotécnicas tais como a transgênese ou clonagem, ou ainda para estudos relacionados à fisiologia embrionária. O método mais difundido de sincronização de estro em cabras envolve um tratamento progestágeno de nove a 11 dias, associado a uma aplicação de luteolítico, 48 h antes da remoção do progestágeno (Baldassarre *et al.*, 2004). Este progestágeno pode ser administrado por meio de CIDR, esponja intravaginal (Romano, 2004) ou implante subcutâneo (Kumar *et al.*, 2003).



Durante a sincronização do estro é realizada a superovulação, a qual pode ser definida como o processo pelo qual é recrutado e selecionado (até chegar à ovulação) um número maior de folículos e geneticamente estabelecido durante um ciclo sexual natural (Lopes-Júnior, 2005). Dentre as drogas utilizadas nesta etapa, a gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) e o hormônio folículo-estimulante (FSH) têm sido empregadas. A eCG tem como vantagens: aplicação simplificada, baixo custo e facilidade de obtenção. No entanto, a longa atividade deste hormônio conduz ao crescimento folicular após a ovulação e as perturbações hormonais podem ser deletérias ao transporte dos gametas e, por conseguinte, à fecundação (Freitas, 2006), além de estimular a produção de anticorpos anti-eCG em altas concentrações (Roy *et al.*, 1999). Em contrapartida, o FSH, extraído da pituitária de suínos ou ovinos se mostra superior à eCG em termos de taxas de ovulação, fecundação e em produção de embriões de boa qualidade, sendo este o principal hormônio utilizado em programas de superovulação. O tratamento mais utilizado em caprinos caracteriza-se pela aplicação de seis injeções, intervaladas por 12 horas e iniciadas três dias antes do término dia do tratamento progestágeno (Freitas, 2006). Alguns grupos de pesquisa têm adicionado o hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) nos protocolos de superovulação, o qual atua como controlador do momento da ovulação (Baldassare *et al.*, 2004).

A fecundação pode ser realizada por monta natural, IA transcervical (Sohnrey & Holtz, 2005) ou, ainda, por laparoscopia (Martinez-Rojero *et al.*, 2006). Em qualquer um dos casos, se faz necessária a utilização de machos de fertilidade comprovada. No que se refere à colheita de embriões, esta pode ser realizada a partir de três métodos: colheita cirúrgica (Cordeiro *et al.*, 2003); sob controle laparoscópico (Mc Kelvey *et al.*, 1986) ou por via transcervical (Lima-Verde *et al.*, 2003). Estes métodos são eficazes, porém apresentam particularidades que precisam ser conhecidas para se decidir qual método será executado.

### **1.3. Produção *in vitro* de embriões caprinos**

### **1.3.1. Colheita de oócitos**

A PIV inicia com a colheita de oócitos ou complexos *cumulus*-oócito (CCOs), necessitando de métodos eficientes para obter maiores taxas de recuperação. Em condições experimentais, os ovários são obtidos após o abate das fêmeas, sem estimulação hormonal prévia. Nesse caso, os ovários são transportados, do abatedouro até o laboratório, em solução de NaCl 0,9%, com antimicrobianos, a uma temperatura de 35 °C (Cognié *et al.*, 2003). Desta forma, os oócitos podem ser obtidos a partir de dissecação, *slicing* ou punção folicular (Martino *et al.*, 1994). No que se refere a esta última, a técnica pode ser realizada com agulhas acopladas a seringas ou bomba de vácuo. O procedimento de punção é simples e rápido. Embora o número de oócitos obtidos seja inferior aos métodos citados anteriormente, esta técnica fornece de um a dois CCOs de boa qualidade por ovário quando comparado às demais (Cognié, 1999).

Os ovários provenientes de abatedouros podem não constituir uma fonte confiável de CCOs devido ao fato do histórico nutricional e sanitário dos animais não ser conhecido, podendo afetar de forma negativa o processo de maturação oocitária. Como método alternativo, pode-se destacar a *ovum pick-up* guiada por laparoscopia (Cox & Alfaro, 2007) ou por ultra-sonografia (Graff *et al.*, 1999) para a recuperação de oócitos em animais vivos de manejo e valor genético conhecido.

Durante o processo de obtenção dos CCOs, a retirada das células do *cumulus* torna os oócitos menos competentes aos fenômenos da maturação, uma vez que, *in vivo*, estas células contribuem para o ambiente intra-folicular de desenvolvimento do oócito (Elder & Dale, 2001).

### **1.3.2. Maturação *in vitro***

Esta etapa visa maturação citoplasmática e nuclear dos oócitos. Estudos realizados demonstram resultados encorajadores a partir da utilização de vários componentes no meio de maturação. Muitos laboratórios utilizam o Meio de Cultivo de Tecidos 199 (TCM-199) acrescido de vitaminas, sendo comprovado seu efeito benéfico sobre o processo de maturação oocitária e conseqüente desenvolvimento embrionário (Tabela 1) (Bormann *et al.*, 2003).

**Quadro 1.** Desenvolvimento *in vitro* de embriões caprinos após a MIV na presença (Vitaminas) ou ausência (Controle) de suplementação vitamínica.

Tratamento	N	% Clivados	% Blastocistos
Controle	618	52,7 ± 3,0 <sup>a</sup>	12,3 ± 1,1 <sup>a</sup>
Vitaminas	613	61,4 ± 2,6 <sup>b</sup>	16,4 ± 1,2 <sup>b</sup>

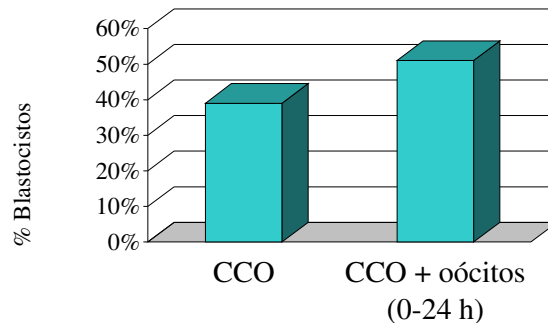
<sup>a, b</sup> Valores com letras sobrescritas diferentes na mesma coluna, diferem ( $P < 0,05$ ).

Fonte: Bormann *et al.* (2003).

A suplementação do meio de maturação com hormônios e fatores de crescimento é necessária para a otimização dos resultados. Neste contexto, vários laboratórios têm adicionado ao meio de MIV, FSH combinado com estradiol (Guler *et al.*, 2000; Kharche *et al.*, 2006), a fim de obter uma maior taxa de maturação oocitária. Embora este esteróide seja rotineiramente adicionado aos meios de MIV em alguns protocolos, ele pode afetar negativamente a maturação nuclear do oócito e o subsequente desenvolvimento embrionário em bovinos (Beker *et al.*, 2002). Vários estudos indicam que fatores de crescimento tais como o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) tem um efeito positivo sobre a maturação nuclear (Kumar & Purohit, 2004), assim como o fator de crescimento epidermal (EGF), que tem sido adicionado em uma concentração fixa de 10 ng/mL no meio de maturação de várias espécies tais como caprinos (Guller *et al.*, 2000), ovinos (Grazul-Bilska *et al.*, 2003), bovinos (Oyamada *et al.*, 2004) e bubalinos (Purohit *et al.*, 2005).

Constituintes de meios semi-definidos como o soro de cabra em estro (SCE), soro fetal bovino (SFB) e a albumina sérica bovina (BSA) têm sido utilizados como fonte protéica no meio de MIV. Karche *et al.* (2006) testaram diferentes concentrações de SCE durante a MIV, verificando uma taxa de maturação de 78,6% quando adicionado 20% de SCE. No entanto, trabalhos comparando a eficiência do SCE, SFB e soro de ovelha em estro (SOE) em diferentes concentrações sobre a maturação nuclear em oócitos caprinos, mostraram que o SCE e SFB têm resultados similares entre si e superiores ao SOE, não havendo diferença entre as concentrações de 10, 15 e 20% de ambos os soros (Tajik & Esfandabadi, 2003). Pode-se destacar também a cisteamina como um dos componentes requeridos para a maturação, já que se trata de uma molécula de baixo peso molecular que, quando presente no meio de MIV, aumenta a concentração ooplasmática de glutathione em vacas (Mertens *et al.*, 2005), cabras (Rodriguez-González *et al.*, 2003) e ovelhas (De Matos *et al.*, 2002) proporcionando maior competência citoplasmática nos oócitos (Cognié *et al.*, 2003).

Tão importante quanto as substâncias que otimizam o processo de maturação, fatores secretados pelos oócitos parecem ter uma grande importância para o aumento na competência de desenvolvimento até o estágio de blastocisto (Figura 4). Hussein *et al.* (2006) verificaram que CCOs maturados *in vitro* com oócitos, aumentam o número de células do trofotoderma. Os oócitos liberam fatores que influenciam indiretamente neste aumento, sendo as células do *cumulus* responsáveis pelo metabolismo destas substâncias.



**Figura 4.** Efeito da maturação dos CCOs com ou sem oócitos, sobre a produção de blastocistos.

Fonte: Hussein *et al.* (2006).

Outros fatores inerentes ao oócito, importantes para melhorias na taxa de maturação são o tamanho folicular e do oócito que influenciam a progressão meiótica em ovinos (Shirazi & Sadeghi, 2007), camelídeos (Kathir *et al.*, 2007) e bovinos (Alm *et al.*, 2006). Aparentemente oócitos maiores têm maior capacidade de retomar a meiose (Shirazi & Sadeghi, 2007). A competência oocitária é adquirida durante a fase de crescimento, quando ocorre a síntese e armazenamento de proteínas e RNAs, o que implica na habilidade não somente para a maturação nuclear, mas também em mudanças citoplasmáticas (Anguita *et al.*, 2007). Tais mudanças servem como suporte para que ocorra uma fecundação de sucesso além de serem necessárias para manter o desenvolvimento embrionário.

Oócitos caprinos são maturados por incubação em 5% de CO<sub>2</sub> a 38,5 °C durante um período de 24 horas (Cognié *et al.*, 2003).

### 1.3.3. Fecundação *in vitro*

A fecundação é um processo complexo que depende do sucesso entre a interação de um oócito maturado com espermatozoides móveis e capacitados. O método mais comum utilizado para a seleção de espermatozoides móveis é o gradiente descontínuo de percoll (45/90%) (Locatelli *et al.*, 2005; Vellila *et al.*, 2005). A capacitação espermática é um evento importante que afeta o sucesso da fecundação *in vitro* (FIV), no entanto, os mecanismos

celulares pelos quais as células espermáticas sofrem esta capacitação ainda não são completamente conhecidos (Mendes *et al.*, 2003). Sabe-se que durante capacitação, o colesterol da membrana plasmática (MP) do espermatozóide é removido, tornando-a instável e aumentando a possibilidade de ocorrer fusão da MP com a membrana acrossomal resultando na reação acrossômica (Figura 2) (Purdy & Graham, 2004), neste contexto, o SOE tem sido adicionado ao meio de capacitação para as espécies caprinas e ovinas. Cognié *et al.* (2003) verificaram que a adição de heparina (0,5 µg/mL) em meio SOF suplementado com 10% de SOE aumenta o número de oócitos fecundados.

Os espermatozóides devidamente capacitados e os oócitos previamente maturados são então cultivados em meio de fecundação sob uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, a 38,5 °C, por 17 horas. Este período foi estabelecido por razões práticas, uma vez que após quatro horas de co-incubação, as taxas de produção de blastocistos são similares às de 17 horas (Cognié *et al.*, 2003). Um tempo superior a este pode ocasionar fecundações polispermáticas e uma redução na formação de blastocistos (Sumantri *et al.*, 1997), devendo-se então, remover os presumíveis zigotos (PZ) e mantê-los em condições de cultivo.

#### **1.3.4. Cultivo *in vitro***

O cultivo *in vitro* (CIV) é ainda uma das etapas limitantes na PIV de embriões caprinos e ovinos. Atualmente, três sistemas de cultivo têm sido utilizados: o co-cultivo com suporte de células somáticas, o cultivo em condições semi-definidas e desenvolvimento *in vivo* no oviduto (Freitas, 2006).

O co-cultivo geralmente é realizado com células do oviduto e apresenta várias vantagens: (a) as células do oviduto podem remover metabólitos tóxicos; (b) liberar fatores ou citocinas que podem auxiliar no desenvolvimento do embrião; (c) reduzir a tensão de O<sub>2</sub>, evitando danos oxidativos ao embrião (Locatelli *et al.*, 2005). Quanto ao cultivo em condições semi-definidas, um dos trabalhos pioneiros em ruminantes realizado por Tervit *et al.* (1972), descreveu o fluido sintético de oviduto (SOF) como meio de cultivo que permite o desenvolvimento de embriões precoces até o estágio de blastocisto. As substâncias adicionadas ao SOF são baseadas nos principais constituintes encontrados no ambiente reprodutivo da fêmea. Por exemplo, as prostaglandinas que são conhecidas como reguladoras das funções reprodutivas uterina e embrionária. Um estudo realizado por Sayre (2007) verificou que a PGE<sub>2</sub> não afeta o desenvolvimento embrionário, no entanto, esta quando em associação com a PGF<sub>2α</sub>, pode melhorar o desenvolvimento embrionário na espécie caprina. O SOF pode ainda ser enriquecido com aminoácidos e albumina sérica bovina (BSA). O cultivo

embrionário poder ser realizado a 38,5 °C em 5% de CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub> em atmosfera umidificada (Freitas, 2006).

Apesar do cultivo *in vivo* ser uma técnica de difícil execução, esta se mostrou superior quando comparado ao cultivo em meio semi-definido (Tabela 2), esse resultado foi obtido com o cultivo *in vivo* de embriões produzidos e cultivados *in vitro* até o estágio de quatro a oito células (Wetscher *et al.*, 2005). Neste contexto, Rodriguez-Dorta *et al.* (2006) verificaram que o ambiente do oviduto aumenta a qualidade dos blastocistos. Essa informação foi verificada pela observação da taxa de sobrevivência após criopreservação e transferência para receptoras. Neste contexto, vários laboratórios utilizam substâncias encontradas no trato reprodutivo da fêmea a fim de obter resultados semelhantes àqueles cultivados *in vitro*. À exemplo dos glicosaminoglicanos que são encontrados em abundância no aparelho reprodutivo e parece ter aplicabilidade nas diferentes etapas da PIV (Furnus *et al.*, 1998).

**Quadro 2.** Desenvolvimento *in vivo* de embriões bovinos oriundos de CCOs transferidos para o oviduto e posteriormente inseminados, gametas depositados no oviduto (GIFTs) e embriões de 4 e 8 células produzidos *in vitro* comparados com o desenvolvimento de embriões maturados, fecundados e cultivados *in vitro*.

Estruturas	Transferidos <i>in vivo</i> , n (%)			Controle <i>in vitro</i> , n (%)
	CCOs	GIFTs	4 e 8 células	4 e 8 células
Transferidas	456	514	682	-
Recuperadas	348 (76,3) <sup>a</sup>	351 (68,3) <sup>b</sup>	545 (79,9) <sup>a</sup>	1.074 (100)
Nº de blastocistos	3 (0,9) <sup>a</sup>	53 (15,1) <sup>b</sup>	294 (41,9) <sup>c</sup>	277 (20,9) <sup>d</sup>

<sup>(a-d)</sup> Entre colunas, as letras diferem significativamente (p < 0,01).

Fonte: Wetscher *et al.* (2005).

#### 2.4. Glicosaminoglicanos

Os glicosaminoglicanos (GAGs) consistem em repetidas unidades dissacarídicas com seqüências que variam na composição, ligação e sulfatação (Handel *et al.*, 2005). Segundo Ernst *et al.* (1995), estas unidades dissacarídicas são constituídas de um resíduo de açúcar não nitrogenado (ácido idurônico, ácido glicurônico ou galactose) e outro de hexosamina (glicosamina ou galactosamina) (Tabela 3). Os GAGs estão ligados à superfície celular, sendo encontrados em abundância na matriz extracelular ou ancorados à membrana plasmática (Turnbull *et al.*, 2001).

As moléculas que constituem os GAGs são: (a) o sulfato de heparina, um polissacarídeo que é encontrado em todas as células do corpo e corresponde entre 50 a 90% do total de proteoglicanos endoteliais (Ihrcke *et al.*, 1993); (b) a heparina, presente na matriz extracelular tem sido explorada terapêuticamente como anticoagulante (Capila & Linhard, 2002); (c) os sulfatos de condroitina e dermatan encontrados na superfície celular e matriz extracelular (Sugahara *et al.*, 2003); (d) o sulfato de queratina, maior componente da córnea e cartilagem (Funderburgh, 2000) e o ácido hialurônico encontrado em abundância na matriz extracelular, o qual está envolvido na lubrificação e viscosidade dos tecidos (Toole, 2004). Frequentemente as funções biológicas atribuídas aos GAGs estão relacionadas aos órgãos onde estes se encontram, no entanto, de forma geral, as principais funções atribuídas são a proliferação, adesão e migração celular (Handel *et al.*, 2005). Esses componentes celulares podem interagir com um enorme número de proteínas incluindo as proteases, as moléculas de sinalização extracelular (como as quimiocinas e fatores de crescimento), dentre outros (Handel *et al.*, 2005).

**Quadro 3.** Principais glicosaminoglicanos e suas unidades dissacarídicas repetitivas.

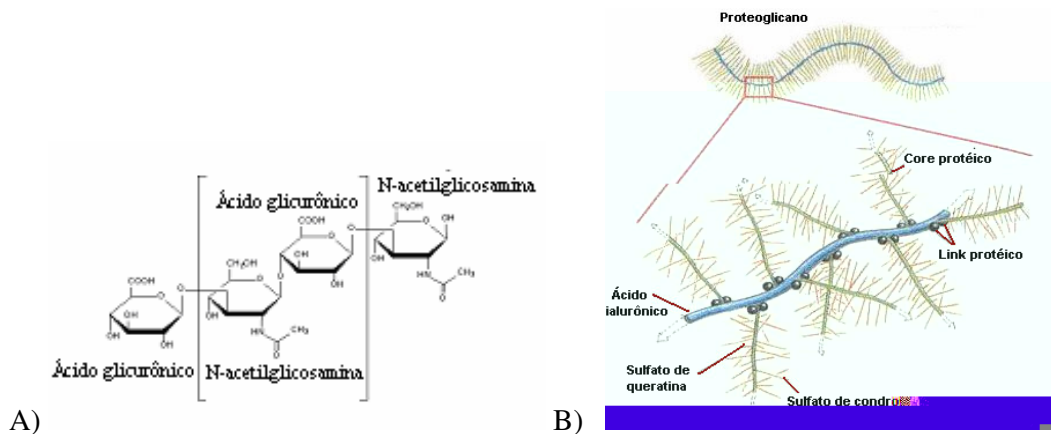
<b>Glicosaminoglicano</b>	<b>Unidade dissacarídica</b>
Ácido hialurônico	Ácido glicurônico; N-acetilglucosamina
Sulfato de condroitina	Ácido glicurônico, sulfato de N-acetilgalactosamina
Sulfato de dermatan	Ácido idurônico, sulfato de N-acetilgalactosamina
Sulfato de heparan	Ácido idurônico, sulfato de N-acetilglucosamina
Sulfato de queratan	Galactose, sulfato de N-acetilglucosamina

Fonte: Ruoslahti & Yamaguchi (1991).

Essas moléculas foram encontradas no fluido ovidutário de várias espécies como ovinos, eqüinos, caninos e suínos (Lee *et al.*, 1986; Varner *et al.*, 1991; Kawakami *et al.*, 2000; Tienthai *et al.*, 2000). Nestas espécies tem sido relatado seu efeito benéfico sobre a capacitação e sobrevivência espermática (Kawakami *et al.*, 2000; Therien *et al.*, 2005). Num estudo realizado por Bergqvist & Rodríguez-Martínez (2006), foi verificada uma concentração maior de GAGs sulfatados (S-GAGs) no segmento da ampola do que no istmo, especialmente no período funcional do oviduto. Esse aumento dos S-GAGs foi atribuído às moléculas existentes no fluido folicular, as quais são liberadas após a ovulação (Grippio *et al.*, 1995), uma vez que também já foi comprovada a existência destas no fluido folicular (Therien *et al.*, 2005).

No que se refere aos sistemas de produção *in vitro*, os GAGs têm sido adicionados aos meios de cultivo embrionário. A heparina foi testada com sucesso em um sistema de desenvolvimento *in vitro*, onde se verificou uma taxa de formação de blastocisto de 21,8% comparada com a do grupo controle, que foi de 16,4% (Kim *et al.*, 2005). Outros trabalhos realizados com sulfato de heparina confirmam o efeito positivo desta através do aumento no





**Figura 6.** Molécula de ácido hialurônico formada por unidades alternadas de ácido glicurônico e N-acetilglicosamina (A). Ácido hialurônico associado com outros GAGs e com proteínas que constituem os proteoglicanos (B).

Fonte: A) [http://www.sigmaaldrich.com/Area\\_of\\_Interest/Biochemicals/Enzyme\\_Explorer](http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer)

B) <http://www.fch.vutbr.cz/home/kucerik/frame1.htm>

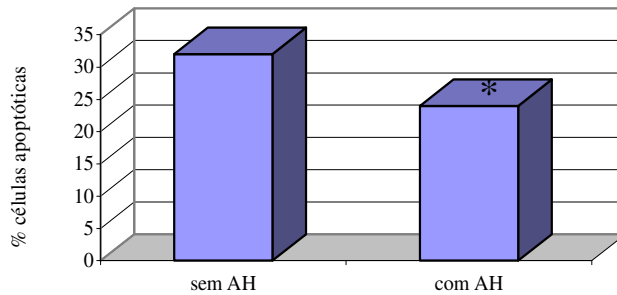
Ao contrário de outros GAGs produzidos intracelularmente, o AH é sintetizado na membrana celular por uma enzima conhecida como Ácido Hialurônico Sintetase (HAS), a qual libera as cadeias formadas para o espaço extracelular (Weigel *et al.*, 1997). Nos mamíferos, a família dessas enzimas consiste de três isoenzimas conhecidas: HAS-1, HAS-2 e HAS-3 (Spicer *et al.*, 1997).

O AH é encontrado em abundância no trato reprodutivo masculino (Sakairi *et al.*, 2007) e feminino (Russell & Salustri, 2006), além dos fluidos folicular (Saito *et al.*, 2000) e ovidutário (Bergqvist & Rodriguez-Martinez, 2006). Trata-se de um constituinte importante na matriz extracelular e em nível tecidual está envolvido na adesão célula-célula (Cohen *et al.*, 2006), além de ter a propriedade de um lubrificante biológico, reduzindo a fricção durante o movimento e fornecendo elasticidade (Varki *et al.*, 1999).

No que se refere à sua participação na reprodução, o AH possui papéis importantes sobre os gametas e embriões. No tocante aos espermatozoides, Kornovsky *et al.* (1994) verificaram que o AH, através do receptor RHAMM (Receptor para Ácido Hialurônico Mediador da Motilidade), é responsável pelo aumento da motilidade espermática. Outros trabalhos mostram que este GAG pode contribuir para o metabolismo espermático (Bucak *et al.*, 2007), atuando também na melhoria da viabilidade e integridade da membrana plasmática após o processo de congelamento e descongelamento (Pena *et al.*, 2004).

O AH pode ter origem nas células do *cumulus* e atuando na expansão destas e participando do seu funcionamento (Kobayashi *et al.*, 1999). O aspecto esponjiforme dos

CCOs expandidos pode facilitar a extrusão do oócito no momento da ovulação além de prevenir a dispersão das células. O AH quando adicionado em meio de cultivo diminui a frequência de oócitos degenerados (Miyano *et al.*, 1994), além de reduzir a incidência de apoptose nas células da granulosa (Figura 7).



**Figura 7.** Determinação, por citometria de fluxo, do efeito de cultivo com AH sobre a incidência de apoptose em células da granulosa.

Fonte: Kaneko *et al.* (2000).

No processo de fecundação, o AH diminui a incidência de polispermia na FIV de suínos (Suzuki *et al.*, 2000). Além disso, Huszar *et al.* (2003) demonstraram que, *in vitro*, o AH é um bom indicador da maturidade e viabilidade espermática. Nesse contexto, em suínos, tem-se adicionado esta molécula para complementação da biotécnica de injeção intracitoplasmática (ICSI), onde o AH, ligado a espermatozoides maduros, auxilia na seleção evitando anormalidades cromossômicas ou perdas embrionárias (Tabela 4).

**Quadro 4.** Análise dos padrões de ploidia em embriões suínos de quatro células produzidos por FIV, ICSI e ICSI-AH.

Grupo	Haplóides	Diplóide	Poliplóide
FIV	7	45	19
ICSI	9	58	13
ICSI-AH	15	74	6

Fonte: Park *et al.* (2005).

Também adicionado em meio de cultivo, o AH auxilia o desenvolvimento de embriões suínos (Miyano *et al.*, 1994; Toyokawa *et al.*, 2005). No entanto, estes efeitos podem variar de acordo com as condições de maturação e fecundação do oócito (Miyoshi *et al.*, 1999). Kim *et al.* (2005) estabeleceram a concentração de AH (0,5 mg/mL) em meio de cultivo para

embriões suínos. Já em bovinos, os melhores resultados no CIV foram obtidos utilizando a dose de 1 mg/mL (Furnus *et al.*, 1998).

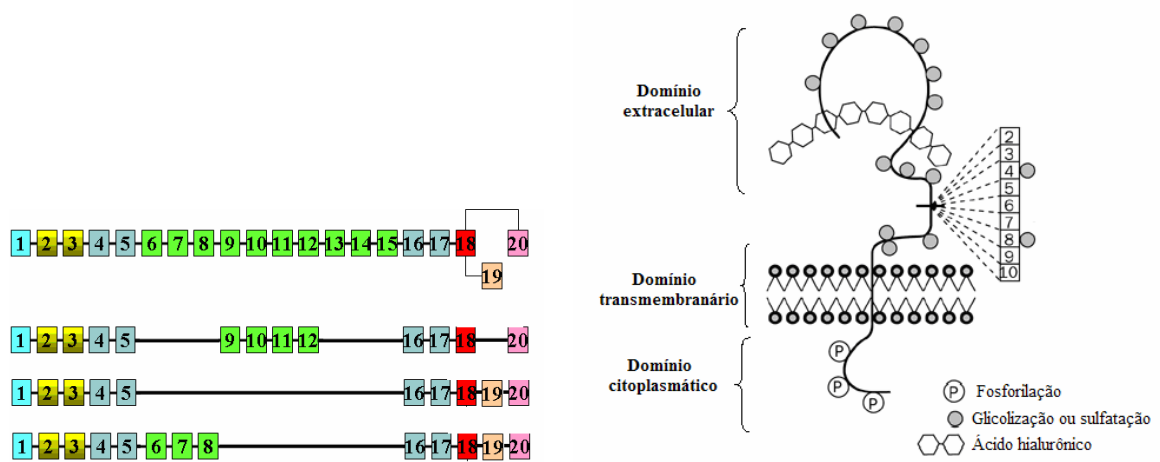
O AH atua através da ligação com seus receptores, sendo o CD44, o seu principal receptor, em oócitos e embriões humanos (Campbell *et al.*, 1995) e bovinos (Valcarcel *et al.*, 1999).

## **1.4.2. CD44**

### **1.4.2.1. Estrutura**

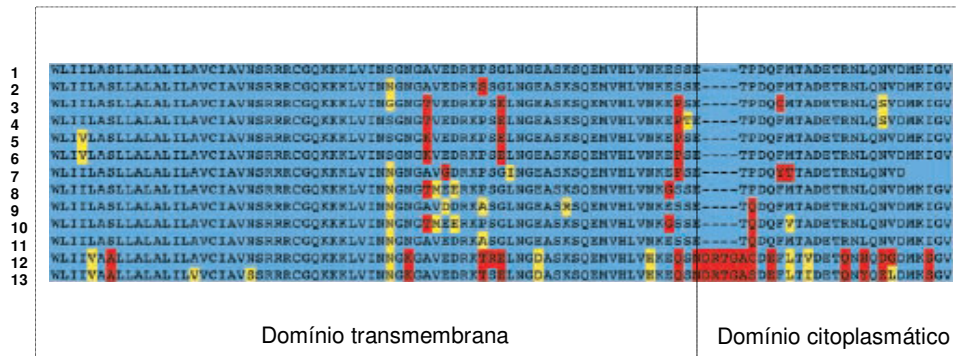
O CD44 é uma glicoproteína de superfície celular de 85 a 100 kDa, a qual reconhece uma seqüência de seis açúcares de hialuronan e media a agregação de células independente de cátion divalente. A família do CD44 pertence a um grande grupo de proteínas ligantes ao AH, denominadas hialaderinas, as quais são responsáveis pela ligação inicial do AH à superfície celular, para que este possa ser internalizado e degradado pelas hidrolases ácidas (Toole, 2004). Em humanos, o gene que codifica o CD44 possui 20 éxons e está localizado no cromossomo 11 (Isacke & Yarwood, 2002). A forma padrão do CD44 consiste em uma seqüência N-terminal (codificada pelo éxon 1), um região ligante ao ácido hialurônico (éxons 2 e 3), uma região formando a haste do receptor (éxons 4, 5, 16 e 17), um domínio transmembrana (éxon 18) e um domínio citoplasmático (éxon 20) (Figura 8A). As formas variantes deste receptor dependem de diferentes combinações dos éxons 6 a 15 (éxons variantes), além do éxon 19 que pode ou não estar inserido no gene deste receptor, decodificando aminoácidos no domínio citoplasmático (Figura 8B) (Thorne *et al.*, 2004).

Na molécula de CD44 (Figura 8C), o domínio extracelular é constituído por 248 aminoácidos, sendo a região amino-terminal relativamente conservada entre as espécies mamíferas, a qual contém um domínio ligante ao AH; enquanto o domínio transmembranário contém 21 aminoácidos e o citoplasmático 72 (Isacke & Yarwood, 2002). Estudos mostram que a estrutura protéica do CD44 de 11 espécies mamíferas e de duas aves compartilham 47 a 93% de aminoácidos semelhantes ao da seqüência humana. O domínio transmembrana se mostra pouco variável. Quanto ao domínio citoplasmático, este último também é conservado, exceto por uma pequena inserção à região terminal nas aves (Figura 9) (Thorne *et al.*, 2004).



**Figura 8.** (A) Organização genômica do CD44, onde cada quadrado representa um éxon. (B) Formas variantes de decodificação do CD44. (C) Representação gráfica da molécula de CD44. Sua estrutura é dividida em três domínios: citoplasmático (encontrado no interior do citoplasma), transmembranário (inserido entre a bicamada fosfolipídica) e extracelular (onde se localiza o sítio de ligação ao AH, encontrado na matriz extracelular). As caixas brancas representam 10 éxons variantes (v1-v10), os quais estão inseridos dentro do domínio

anteriormente, a clivagem da molécula pode levar à expressão de outras. Componentes da matriz extracelular têm sido descritos como ligantes para o CD44, tais como o colágeno, a fibronectina, os proteoglicanos sulfatados e o ácido hialurônico (Choi *et al.*, 2006).



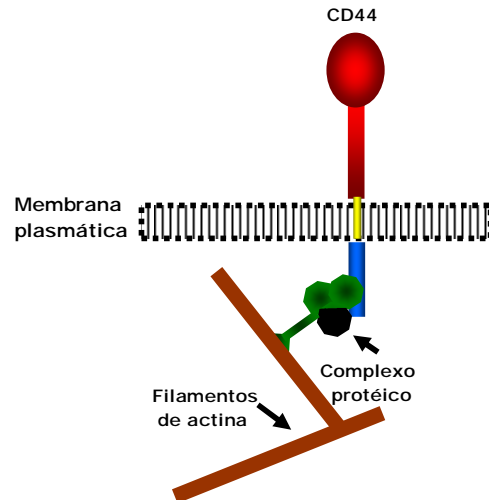
**Figura 9.** Comparação das seqüências de aminoácidos do domínio citoplasmático e transmembrana do CD44 em 13 espécies. Legenda das espécies: 1 – humano, 2 – babuíno, 3 – camundongo, 4 – rato, 5 – hamster chinês, 6 – hamster golden, 7 – canino, 8 – bovino, 9 – equino, 10 – caprino, 11 – rinoceronte, 12 – galinha, 13 – pato. Comparando com a seqüência de humano, os aminoácidos idênticos, fisio-quimicamente conservados e os não conservados são mostrados em azul, amarelo e vermelho respectivamente.

Fonte: Thorne *et al.* (2004).

A ligação entre o CD44 e o AH pode mediar a interação célula-célula e da matriz extracelular e célula, sendo importante em uma variedade de processos fisiológicos e patofisiológicos, incluindo metástase de tumor, cicatrizações de feridas e acúmulo de leucócitos em locais de inflamação (Bajorath, 2000). Iakob & Knudson (2006) sugeriram que as interações entre o AH e o CD44 promovem sinalizações importantes para a homeostase da cartilagem. O mecanismo pelo qual ocorre a internalização do AH não é bem conhecido, mas parece claro que o domínio citoplasmático interage com componentes celulares. No processo de migração celular, por exemplo, o domínio citoplasmático do CD44 não contém sítios ligantes à actina, sendo esta interação (CD44 e citoesqueleto) mediada por proteínas ligadas ao citoesqueleto (Figura 10) (Thorne *et al.*, 2004). O CD44 está envolvido na manutenção de órgãos e tecidos. O epitélio que se encontra em proliferação e as suas células sob reparo parecem ser regulados pela interação entre o AH e o CD44 (Jain *et al.*, 1996). No que se refere à adesão celular, esta é decorrente da ligação do AH junto ao receptor de células adjacentes (Cooper & Dougherty, 1995).

A interação do AH junto ao CD44 parece estar envolvida na função dos gametas e no trato reprodutivo feminino em termos de proliferação, adesão, migração, maturação e

desenvolvimento embrionário (Tienthai *et al.*, 2003). Diante disto, vários estudos investigam a expressão do CD44 no epitélio ovidutário de caprinos (Kimura *et al.*, 1995), suínos (Tienthai *et al.*, 2003) e bovinos (Bergqvist & Rodriguez-Martinez, 2006), além de ter sido identificado no epitélio cervical, no endométrio e na placenta humana (Woerner *et al.*, 1995; Saegusa *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2006).



**Figura 10.** Esquema da participação do CD44 sobre o movimento do citoesqueleto. O domínio citoplasmático da molécula CD44 se liga através da fosforilação a um complexo proteico que tem um sítio de ligação aos filamentos de actina.  
Fonte: Thorne *et al.* (2004).

Estudos revelam que o CD44 é expresso em células do *cumulus* (CC) (Campbell *et al.*, 1995; Kimura *et al.*, 2002) sendo o nível de expressão dessas células maior do que o das células da granulosa, e CCOs maturados apresentam uma maior expressão do que aqueles imaturos (Otha *et al.*, 1999). Também foram verificadas diferenças no peso molecular entre CC de oócitos maturados *in vivo* e *in vitro*, isto pode ser ocasionado pela glicosilação da molécula e assim explicar as diferenças na habilidade ligante ao AH (Yokoo *et al.*, 2002). Estas observações sugerem que o CD44 pode contribuir para a qualidade oocitária. Neste contexto, Yokoo *et al.* (2007) provou através da adição de anticorpos anti-CD44 em meio de cultivo, que a interação entre o CD44 e AH aumenta o número de oócitos que atingem o estágio nuclear de metáfase II (MII) (Tabela 5). Um estudo semelhante foi realizado por Kaneko *et al.* (2000) que verificou através de metodologia semelhante, que a relação do AH com seu receptor diminui o nível de células apoptóticas.

**Quadro 5.** Efeito de diferentes concentrações de anticorpo anti-CD44 sobre a maturação de oócitos suínos.

<b>Tratamento</b>	<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>VG (%)</b>	<b>MI (%)</b>	<b>MII (%)</b>
Anti-CD44	0	19,4 <sup>a</sup>	9,8 <sup>ab</sup>	73,8 <sup>a</sup>
	1,0	40,0 <sup>b</sup>	20,0 <sup>a</sup>	40,0 <sup>b</sup>
	5,0	90,2 <sup>c</sup>	9,8 <sup>ab</sup>	0 <sup>c</sup>
IgG normal	5,0	17,2 <sup>a</sup>	7,8 <sup>b</sup>	75 <sup>a</sup>

Valores sobrescritos diferem (p<0,05)

VG – vesícula germinativa; MI – metáfase I e MII – metáfase II.

Fonte: Yokoo *et al.* (2007).

É sabido que a síntese de glicosaminoglicanos pelas células epiteliais do endométrio ocorre nos estágios iniciais da gestação (Zorn *et al.*, 1995). Durante a implantação, o trofotoderma se liga à superfície do endométrio, onde várias moléculas de adesão, como por exemplo, as integrinas e o CD44, têm sido identificadas com um papel importante neste processo (Aplin, 1997). Neste contexto, estudos utilizando a técnica de imunofluorescência mostraram que o CD44 está presente em embriões até o estágio de blastocisto em humanos, bovinos e suínos (Campbell *et al.*, 1995; Furnus *et al.*, 2003; Toyokawa *et al.*, 2005). Por meio de testes de RT-PCR e Southern blot, Kim *et al.* (2005) confirmaram a presença deste receptor em embriões de 2-, 4- e 8 células além de mórulas e blastocistos da espécie suína, todos derivados da produção *in vitro*. No entanto, apenas quando foi adicionado AH (0,5 mg/mL) houve um aumento nas células do trofotoderma. Esta ação pode ser atribuída aos níveis protéicos existentes.

Neste contexto, maiores estudos são necessários para elucidar a importância deste receptor de membrana nos processos fisiológicos durante a embriogênese inicial, bem como os mecanismos pelos quais este atua junto ao AH.

## JUSTIFICATIVA

A região Nordeste do Brasil apresenta uma série de entraves para seu desenvolvimento, sendo que um dos principais é seu atraso tecnológico em áreas do conhecimento imprescindíveis para solução de problemas graves, como aqueles ligados à produtividade animal e ao domínio de modernas biotécnicas. Na elucidação desses problemas, torna-se essencial o exercício da melhor ciência, compatível com aquele praticado nos centros mais desenvolvidos, tanto no Brasil como em outros países. Nesse sentido, a biotecnologia pode ser uma ferramenta eficiente para solução destes problemas.

Na área de reprodução animal, a produção de embriões (*in vitro* e *in vivo*) apresenta-se como uma biotécnica essencial para obter-se a formação de recursos humanos bem como para contribuir com o melhoramento genético do rebanho.

Na produção *in vitro* de embriões caprinos, têm sido testados vários suplementos para os meios de cultivo visando uma maior viabilidade e qualidade embrionária. No entanto, a adição de AH nesses meios não tem sido adotada. Isto se deve à escassez de informações sobre expressão de receptores para AH, dentre os quais, o CD44. Assim, faz-se necessário investigar sua presença e observar em qual momento este se expressa nos oócitos e embriões para, posteriormente, verificar em qual situação ele deve ser adicionado ao meio de cultivo, visando aperfeiçoar a produção *in vitro* de embriões desta espécie.



## **HIPÓTESE CIENTÍFICA**

O CD44, receptor para o ácido hialurônico, é expresso em oócitos imaturos, maturados e embriões precoces de caprinos.

## **OBJETIVOS**

### **Geral**

Realizar um estudo investigativo sobre a presença do CD44 em oócitos e embriões caprinos.

### **Específicos**

- a) Testar metodologia para identificação do CD44 em oócitos e embriões caprinos.
- b) Verificar a presença do CD44 em oócitos imaturos e após a maturação *in vitro*.
- c) Verificar a presença do CD44 em embriões prónucleares, de 2-, 4- e 8 células.

## Capítulo 1

Anti-human CD44 antibodies are applicable in immunohistochemical and immunofluorescence detection in both goat lymphocytes and oocytes

**Enviado para:** Research in Veterinary Science

**Fator de Impacto:** 1,106

### Resumo

Com o objetivo de determinar se anticorpos monoclonais (mAb) anti-humano para CD44 reconhecem este receptor em caprinos, lâminas com linfócitos e oócitos imaturos foram submetidas aos métodos de imunohistoquímica e imunofluorescência utilizando dois clones (A3D8 e DF1485). Linfócitos humanos foram utilizados como controle positivo e o anticorpo primário foi omitido para realização do controle negativo. Linfócitos e oócitos caprinos apresentaram tanto a marcação fluorescente, como química. Uma marcação fluorescente homogênea foi demonstrada sobre a membrana plasmática de oócitos caprinos imaturos, principalmente com o clone DF1485. Parece que o CD44 caprino expressa epítomos, os quais te m reação cruzada com anticorpos para CD44 anti-humano. Assim, os mABs A3D8 e DF1485 podem ser utilizados com sucesso para detecção do CD44 em caprinos.

Palavras-chave: Caprino; linfócito; oócito; CD44

**Anti-human CD44 antibodies are applicable in immunohistochemical and immunofluorescence detection in both goat lymphocytes and oocytes**

**M.L.L. Andrade <sup>a</sup>, J.V. Luz <sup>a</sup>, K.C. Almeida <sup>a</sup>, M.H.G. Faria <sup>b</sup>, L.M. Melo <sup>a</sup>, V.J.F. Freitas <sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup> *State University of Ceará, Laboratory of Physiology and Control of Reproduction, Fortaleza, Brazil*

<sup>b</sup> *Federal University of Ceará, Laboratory of Molecular Genetics, Fortaleza, Brazil*

\* Corresponding author: Tel.: + 55 85 31019861; fax: + 55 85 31019840; E-mail: [vjff@pq.cnpq.br](mailto:vjff@pq.cnpq.br) (V.J.F. Freitas).

**Abstract**

In order to determine if anti-human CD44 monoclonal antibodies recognize goat receptors, slides with lymphocytes and immature oocytes were submitted to immunohistochemical and immunofluorescence methods using two monoclonal antibodies clones (A3D8 and DF1485). Normal human lymphocytes were used as positive control and primary antibody was omitted as the negative control. Goat lymphocytes and oocytes showed both chemical and fluorescent staining. Homogeneous fluorescent labeling was demonstrated on the plasma membrane of goat immature oocytes mainly with the DF1485 clone. It appears that goat CD44 expresses epitopes which cross-react with anti-human CD44 antibodies. Thus, the A3D8 and DF1485 mAbs can be used successfully for CD44 detection in goats.

*Keywords:* Goat; Lymphocyte; Oocyte; CD44

CD44 is a membrane glycoprotein found in a large variety of isoforms that constitute a family of adhesion molecules (Aruffo et al., 1990). This glycoprotein is the principal cell surface receptor for hyaluronic acid with multiple functions, including cell-cell interactions, cell-matrix interactions, and signal transduction (Handel et al., 2005). Anti-human CD44 monoclonal antibodies (mAbs) have been used to identify this receptor on reproductive tissues, oocytes and embryonic cells of some species (Furnus et al., 2003; Tienthai et al., 2003). However, to our knowledge, they have not been shown to recognize CD44 receptor on goat gametes. Thus, this study was carried out in order to determine the applicability of two commercial anti-human CD44 mAbs (A3D8 and DF1485 clones) in staining CD44 receptors on goat lymphocytes and immature oocytes.

The handling of experimental animals was in agreement with institutional and internationally accepted animal welfare guidelines (American Veterinary Medical Association-AVMA, 2001). Human and goat lymphocytes were isolated according to the technique described by Chen et al. (1997), using fresh heparinized peripheral blood. Goat ovaries were obtained at local abattoirs and oocytes were aspirated from visible follicles through a vacuum line connected to a tube with TCM-199. Lymphocytes were submitted to cytocentrifugation, while oocytes were mounted on poly-L-lisine-coated slides. The cells were fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized with Triton X-100 and washed three times in PBS. Two different mouse anti-human CD44 mAbs were used: A3D8 (Sigma, Saint Louis, USA) and DF1485 (Vision BioSystem, Newcastle, UK). The samples were incubated overnight at 4°C with A3D8 (1:20), DF1485 (1:40) or without primary antibody (negative control) and washed in PBS. Staining of normal human lymphocytes was used as positive control. Immunohistochemistry was performed according to the method described by Faria et al. (2006). Secondary biotinylated goat anti-mouse antibody, streptavidin-biotin-peroxidase

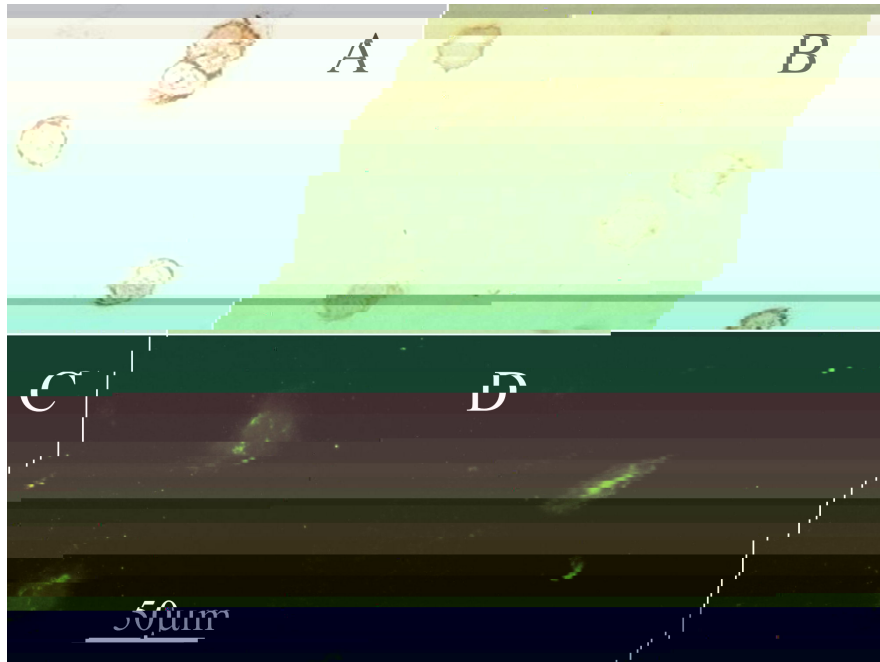
complex and diaminobenzidine were purchased from DakoCytomation (Carpinteria, USA). Tissue sections were lightly counter-stained with hematoxylin and then examined by light microscopy. For immunofluorescence, the slides were incubated with fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-mouse immunoglobulin (Sigma, Saint Louis, USA). Each specimen was also stained with the fluorescent dye Hoechst 33342 (Sigma, Saint Louis, USA) to check the presence of the germinal vesicle in immature oocytes. The slides were examined under a epifluorescence microscope (Nikon E400, Tokio, Japan) equipped with a B-2A filter for FITC and UV-2A filter for Hoechst 33342.

Immunohistochemical and immunofluorescence analysis revealed that CD44 was expressed on goat lymphocytes (Fig. 1 B and D) and immature oocytes (Fig. 2) as well as on human lymphocytes (Fig. 1 A and C). A specific staining was observed on goat lymphocytes in comparison to negative control (data not shown). Fluorescent lymphocyte labeling was similar between the species. However, chemical staining was higher in human than in goat lymphocyte.

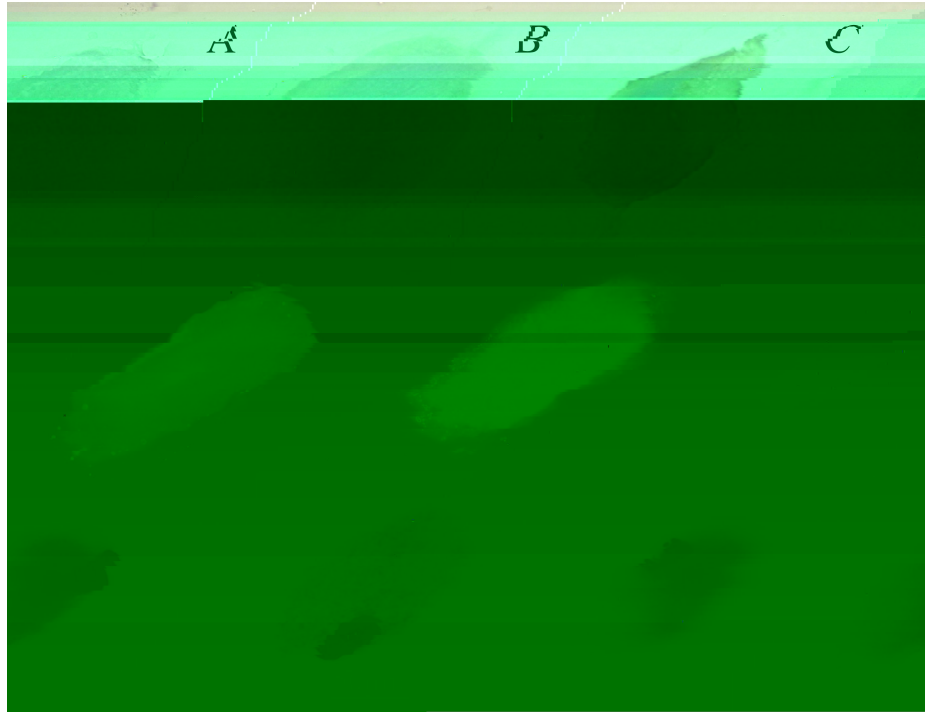
A total of 50 oocytes from slaughterhouse-derived goat ovaries were processed and these immature oocytes showed a positive and specific staining with either DF1485 or A3D8 mAbs (Fig. 2 B, C, E and F) when compared to controls (Fig. 2 A and D). In all cases of negative controls, fluorescence was consistently undetectable. In both chemical and fluorescent methods, the oocyte labeling with DF1485 was slightly greater than with A3D8. The immature condition of oocytes was confirmed by germinal vesicle visualization in all fluorescent stained oocytes (Fig. 2 G, H and I).

CD44 variant isoforms have been described in murine lymphocytes (Rafi et al. 1997) and porcine immature oocytes (Kimura et al., 2002). Our results show the presence of CD44 receptor on goat lymphocytes and immature oocytes. Despite the existence of a relatively

nonconserved membrane-proximal region (35 to 45% similarity) in the extracellular domain of mammalian CD44 receptors (Isacke and Yarwood, 2002), a highly conserved amino terminal region (~85% identity) could explain the recognition of goat receptors by anti-human CD44 mAbs. The use of anti-human mAbs was also described for CD44 detection in cow (Furnus et al., 2003) and pig (Yang and Binns, 1993).



**Fig. 1.** Immunohistochemical (A and B) and immunofluorescent (C and D) detection of CD44 receptor on human (A and C) and goat (B and D) lymphocytes using anti-human monoclonal antibody (DF1485 clone).



**Fig. 2.** Immunohistochemical (A, B and C) and immunofluorescent (D, E and F) detection of CD44 receptor on goat immature oocytes using A3D8 (B and E) or DF1485 (C and F) anti-human monoclonal antibodies. In A and D, primary antibody was omitted as the negative control. The immature condition of oocytes was confirmed by germinal vesicle visualization after Hoechst staining (G, H and I).

In conclusion, we have provided evidence that the A3D8 and DF1485 anti-human CD44 antibodies can be used successfully for the detection of goat CD44 receptors. Therefore, these antibodies, especially DF1485, can be used as an important tool to investigate CD44 expression in goat cells for the purpose of elucidating their physiological role. Further experiments with both mature oocytes and early embryos are necessary to verify the expression of CD44 and to elucidate the complete actions in which CD44 and hyaluronic acid are involved during embryo development.

## **Acknowledgments**

This project was financially supported by a grant from CNPq (Brasília, Brazil). M.L.L. Andrade was recipient of FUNCAP (Fortaleza, Brazil). V.J.F. Freitas is an investigator of CNPq (Brasília, Brazil). We thank Dr. A. Leyva for English editing of the manuscript.

## **References**

American Veterinary Medical Association (AVMA), 2001. Report of the AVMA panel on euthanasia. *Journal of American Veterinary Medical Association* 218, 669–696.

Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B., Seed, B., 1990. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61, 1303–1313.

Chen, Y.M., Yang, W.K., Ting, C.C., Tsai, W.Y., Yang, D.M., Whang-Peng, J., Perng, R.P.

1997. Cross regulation by IL-10 and IL-2/IL-12 of the helper T cells and the cytolytic activity of lymphocytes from malignant effusions of lung cancer patients. *Chest* 112, **sai2Tf 1.0043 0 0**



- Kimura, N., Konno, Y., Miyoshi, K., Matsumoto, H., Sato, E., 2002. Expression of hyaluronan synthases and CD44 messenger RNAs in porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. *Biology of Reproduction* 66, 707–717.
- Rafi, A., Nagarkatti, M., Nagargatti, P.S., 1997. Hyaluronate-CD44 interaction can induce murine B-cell activation. *Blood* 89:2901.
- Tienthai, P., Yokoo, M., Kimura, N., Heldin, P., Sato, E., Rodriguez-Martinez, H., 2003. Immunohistochemical localization and expression of the hyaluronan receptor CD44 in the epithelium of the pig oviduct during oestrus. *Reproduction* 125, 119–132.
- Yang, H., Binns, R.M., 1993. Isolation and characterization of the soluble and membrane-bound porcine CD44 molecules. *Immunology* 78, 547–554.

## Capítulo 2

### Identification of CD44 (hyaluronic acid receptor) in goat oocytes and early stage embryos

**Enviado para:** Small Ruminant Research

**Fator de Impacto:** 0,777

#### Resumo

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo encontrado na matriz extracelular na maioria dos tecidos animais, o qual exerce importante influência sobre a fisiologia celular. O AH é o mais abundante dos glicosaminoglicanos (GAGs) encontrados em vários tecidos animais, sendo o CD44, principal receptor de membrana celular para o AH, expresso em embriões humanos, murinos, bovinos e suínos. O objetivo do presente trabalho foi determinar, por imunofluorescência, se o CD44 está presente em oócitos (imaturos e maturados) e embriões em estágio precoce de caprinos. Os oócitos foram obtidos de ovários de abatedouro e, após a seleção, um grupo (imaturos) foi separado para o ensaio de imunofluorescência e outro para o procedimento de maturação *in vitro* (MIV). Após a maturação, os oócitos também foram submetidos à imunofluorescência. Para obter embrião

em que foi menos intenso. Em conclusão, o CD44 é expresso em oócitos imaturos e maduros, bem como embriões precoces caprinos.

Palavras-chave: Caprino; oócito; embrião; CD44; ácido hialurônico

**Identification of CD44 (hyaluronic acid receptor) in goat oocytes and early stage embryos**

Maria L.L. Andrade<sup>a</sup>, Juliana V. Luz<sup>a</sup>, Mário G. Farias<sup>b</sup>, Agostinho S. Alcântara-Neto<sup>a</sup>,  
Dárcio I.A. Teixeira<sup>a</sup>, Vicente J.F. Freitas<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução, Universidade Estadual do Ceará, 60740-000, Fortaleza-CE, Brazil*

<sup>b</sup> *Laboratório de Genética Molecular, Universidade Federal do Ceará, 60455-760, Fortaleza-CE, Brazil*

Corresponding author: Vicente José de Figueirêdo Freitas  
Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução  
Universidade Estadual do Ceará-Faculdade de Veterinária  
Av. Paranjana, 1700 – Fortaleza, CE, 60.740-000  
BRAZIL  
Phone: 55-85-3101-9861  
Fax: 55-85-3101-9850  
E-mail: [vjff@pq.cnpq.br](mailto:vjff@pq.cnpq.br)

## **Abstract**

Hyaluronic acid (HA) is a polysaccharide found in the extracellular matrix of most animal tissues that exerts important influences on cell physiology. HA is one of the most abundant glycosaminoglycans (GAGs) found in several animal tissues, being that CD44, the principal cell membrane receptor for HA, is expressed in human, murine, bovine and swine embryos. The aim of the present work was determine, by immunofluorescence, whether CD44 is present in goat oocytes (immature and mature) and early stage embryos. Oocytes were obtained from slaughter ovaries and, after selection; a group (immature) was separated for immunofluorescence assay and another for *in vitro* maturation (IVM) procedure. After maturation, oocytes were also submitted to immunofluorescence. In order to obtain early stage embryos, six goats were treated for estrus synchronization and superovulation using a standard hormonal protocol. Goats in estrus were mated by bucks of known fertility. The presumptive zygotes were recovered by oviductal flushing and *in vitro* cultured until achieved the 2-, 4- and 8-cell-stage for immunofluorescence assay. The CD44 detection was performed using A3D8 clone. CD44 showed to be immunoreactive in both immature and matured oocytes as well as in pronuclear, 2-, 4- and 8 cell stage embryos. The staining was similar for all observed stages, in exception to immature oocytes where was less intense. In conclusion, CD44 is expressed on goat immature and mature oocytes as well as in early stage embryos.

**Keywords:** Goat; Oocyte; Embryo; CD44; Hyaluronic Acid

## 1. Introduction

An efficient culture system for goat *in vitro* fertilization (IVF) embryos is important not only for use in basic research but also in embryo manipulation including transgenesis and cloning. Although IVF and embryo production using *in vitro* matured goat oocytes have been successful, their developmental potential is still lower than that of oocytes matured and fertilized *in vivo* (reviewed in Cognié et al., 2004). Many laboratories have tried to overcome inadequacies of their culture systems by supplementing culture media with various components that may be advantageous for different stages of embryo development. In pigs, Kim et al. (2005) demonstrated that supplementation of culture media with glycosaminoglycans (GAGs) increased the quality of blastocyst by increasing total cell numbers and improved the development of embryos to the blastocyst stage.

GAGs are negatively charged polysaccharide chains of variable length and play an important role in proliferation and differentiation of a variety of cell types. The GAGs are abundant in the female reproductive tract (Jensen and Zachariae, 1958), follicular (Therien et al., 2005), oviductal (Bergqvist and Rodriguez-Martinez, 2006), and uterine fluid (Kawakami et al., 2000).

Hyaluronic acid (HA) is a high molecular weight polysaccharide found in the extracellular matrix of most animal tissues and is one of the most abundant GAGs in the uterine, oviductal and follicular fluids in human (Suchanek et al., 1994), pig (Archibong et al., 1989) and cattle (Lee and Ax, 1984). Moreover, HA added to culture medium improves *in vitro* bovine embryo development to the blastocyst stage (Furnus et al., 1998).

CD44, the principal cell membrane receptor for HA (Aruffo et al., 1990), is a cell-surface glycoprotein of 85-100 kDa which recognizes a six-sugar sequence of hyaluronan and mediates the divalent-cation-independent aggregation of cells (Underhill, 1982). In addition,

CD44 is expressed in human embryo (Campbell et al., 1995) and bovine oocytes and embryos in different stages of development (Furnus et al., 2003).

At our knowledge, there is no information about the expression of CD44 in both goat oocytes and embryos. Thus, the aim of this study was investigate whether CD44 receptor is present on the goat oocytes and early stage embryos by immunofluorescent techniques.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Reagents and media**

Antibody was obtained from Sigma Chemical Co. (A3D8 clone, St. Louis, MO, USA). The monoclonal anti-human CD44 purified mouse immunoglobulin reacts with peripheral blood leukocytes, bone marrow's nucleated cells, medullary thymocytes, liver Kupffer cells, fibroblast, corneal cells, a subset of pancreatic acinar cells and brain cells. The following reagents were also purchased from Sigma: purified goat anti-mouse-fluorescein isothiocyanate (FITC-IgG) conjugate adsorbed against human, bovine and horse serum proteins that was used as secondary antibody, Triton X-100 reduced, TCM-199, bovine serum albumine (BSA-fatty acid free), heparin sulfate, gentamycin, cysteamine, epidermal growth factor (EGF), Hepes and Hoechst 33342. Phosphate buffered saline (PBS) and synthetic oviduct fluid (SOF) supplemented with BSA were purchased from Nutricell (Campinas, SP, Brazil). The maturation medium used in this study was bicarbonate-buffered TCM-199 supplemented with 10 ng/ml EGF, 100  $\mu$ M cysteamine e 40  $\mu$ g/ml gentamycin. The medium for embryo culture consisted of SOF supplemented with BSA. For *in vivo* embryo production the following products were used: intravaginal sponges with 60 mg medroxyprogesterone acetate (Progespon, Syntex, Argentina), cloprostenol (Prolise, Syntex, Argentina), pFSH (Folltropin-V, Vetrepharm, Ontario, Canada) and GnRH (Fertagyl, Intervet, Boxmeer, Holanda).

## 2.2. Ethics

This study was approved by the Animal Ethics Committee of the State University of Ceará (CEUA/UECE). The management of experimental animals was in agreement with institutional and internationally accepted welfare guidelines.

## 2.3. Oocyte recovery

Goat ovaries were obtained from an abattoir and transported to the laboratory in NaCl solution (0.9%) with antibiotics at 37°C within 3 h of slaughter. Cumulus–oocyte complexes (COCs) were aspirated from all visible follicles using a 18-g needle connected to a sterile test tube and to a vacuum pump (Pioneer Pro-Pump, Guilford, USA) which maintained a vacuum pressure approximately 30-50 mmHg in the drainage line. The test tube contained 4 ml of TCM-199 supplemented with Hepes (2.38 mg/ml), heparin (2 µl/ml) and gentamycin (40 µg/ml). Aspirated COCs were washed in TCM 199-gentamycin and were morphologically evaluated for quality. Good quality COCs were selected using a low magnification (20-40X) stereomicroscope (Nikon SMZ-800, Kawasaki, Japan). After evaluation, immature oocytes were submitted to immunofluorescence.

## 2.4. *In vitro* maturation (IVM)

Selected COCs were allowed to mature *in vitro* for 24 h in four-well plates (Nunclon, Roskilde, Denmark) containing 500 µl maturation medium at 38.5°C, in humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air. After maturation, the cumulus cells were partly or totally removed by gentle pipeting and matured oocytes were submitted to immunofluorescence.



### 2.5. *In vivo* embryo production

Six cyclic goats were used as embryo donors. The timing of estrus was synchronized with the placement of intravaginal sponges for 10 days and an injection of 75 µg cloprostenol on the morning of the eighth day. Goats received 200 mg pFSH given twice daily in decreasing doses over 3 days (50/50, 25/25 and 25/25 mg) starting 48 h prior to sponge removal. Thirty-six hours after sponge removal, donors received 100 µg GnRH and were hand bred at 36 and 48 h after sponge removal using bucks of known fertility. Embryos were recovered by laparotomy 72 h following sponge removal. Ovaries were observed for fresh ovulation sites to serve as an estimate of the number of embryos expected. The oviduct was then flushed retrogradely with 10-15 ml of sterile phosphate-buffered saline. The flushing medium was collected into sterile Petri dishes and examined under a stereomicroscope for the presence of ova/embryos. The recovered structures were cultured at 38.5°C, in humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air for 36 h. Samples of embryos in different developmental stages were used for immunofluorescence.

### 2.6. Immunofluorescence

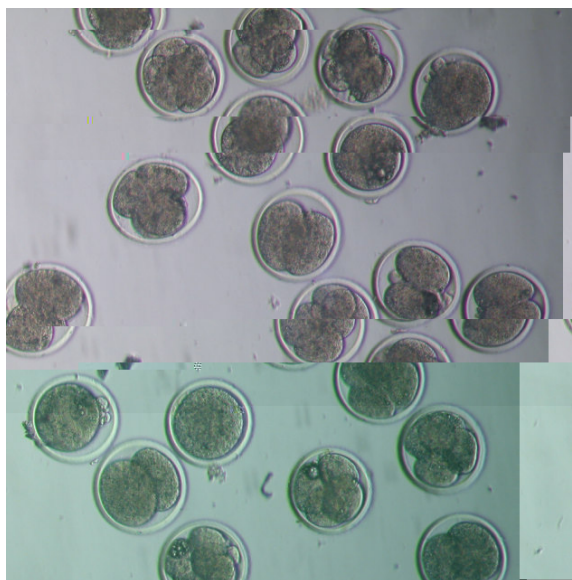
Immunofluorescence assay was performed using between 12 and 50 specimens for each stage studied, i.e., immature and matured oocyte, 1-, 2-, 4- and 8-cell-stage embryo. The oocytes and embryos were deposited on a poly-L-lysine slide (Polysciences Inc., Eppelheim, Germany) and were fixed in 4% formaldehyde in PBS at room temperature. After 20 min, the samples had been made permeable with Triton X-100 and washed in PBS. The oocytes and embryos were incubated at 4°C for 16-18 h in the monoclonal antibody to CD44 which was diluted at 1/20 in PBS-BSA (3%). After three washes in PBS, the sample were incubated with FITC conjugated anti-mouse IgG diluted at 1/100 in PBS-BSA (1%) in dark for 60 min. Negative controls were processed as above, but without the first antibody in order to establish background fluorescence. Each specimen was also stained with the fluorescent dye Hoechst

33342 to check the presence of the polar body and metaphase plate in matured oocytes, two normal pronuclei or the nucleus number in early stage embryos. Samples were mounted with 90% glycerol/10% PBS on glass slides, and observed with a microscope under epifluorescence illumination (Nikon Eclipse E400, Tokyo, Japan), using a B-2A filter for fluorescein (excitation wavelength: 450-490 nm) and UV-2A filter for Hoechst 33342 (excitation wavelength: 330-380 nm).

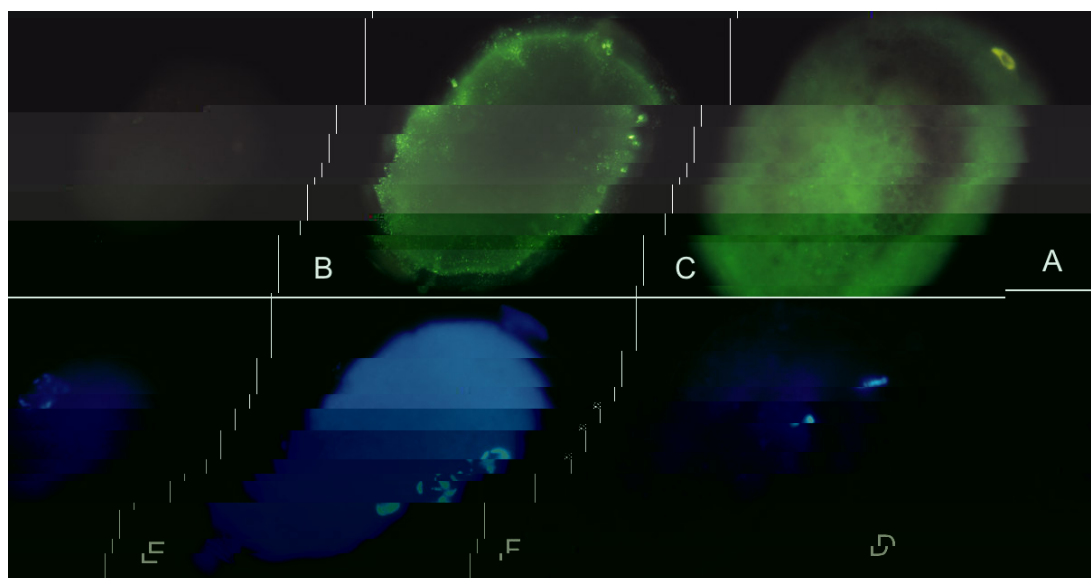
### **3. Results**

A total of 440 oocytes from slaughterhouse-derived ovaries were processed. For IVM, 126 oocytes were incubated, obtaining a maturation rate of 65.9% (n = 83). Concerning the *in vivo* embryo production, in six embryo donors were observed a total of 88 ovulations. After oviductal flushing, it was verified a recovery rate of 69.3% (61/88). The samples of embryos in different stages of development were recovered during a period of 36 h-incubation (Fig. 1). The fluorescence was consistently undetectable in all samples prepared as negative controls (Fig. 2). The distribution of immunoreactive CD44 in immature and matured oocytes is also showed in the Fig. 2. After *in vivo* fertilization and *in vitro* culture, the distribution of CD44 was observed in pronuclear stage zygotes and embryos in different stages of development (Fig. 3).

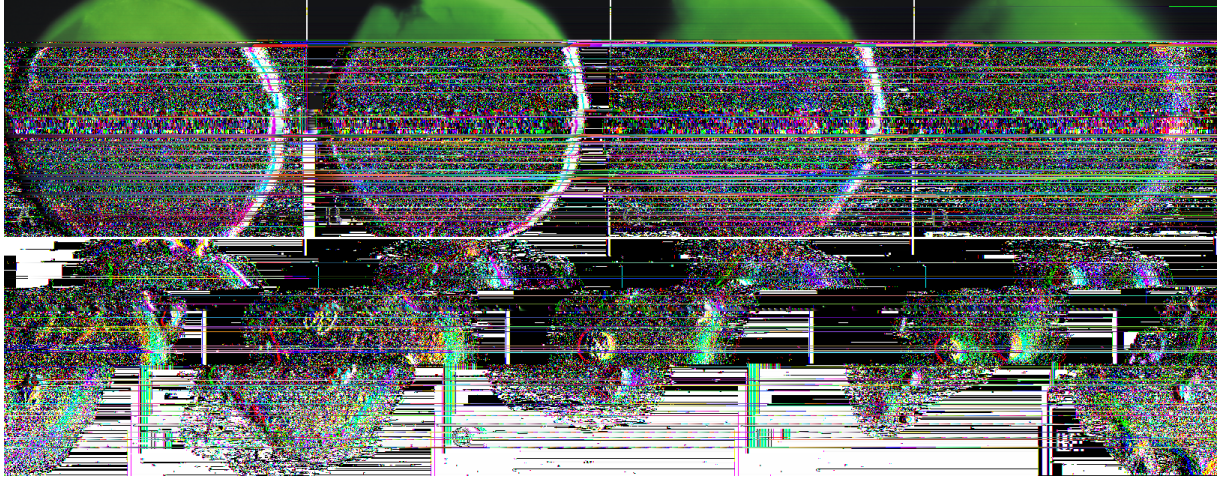
The immature oocytes showed a less intense staining when compared to the matured oocytes and early stage embryos. Staining was intense and homogeneous in all observed specimens (at least 10 for each stage). The monoclonal antibody used in this study showed that the receptor is present on the surface and cytoplasm of the oocytes and early embryos.



**Fig. 1.** Goat early embryos recovered by oviductal flushing and cultured for 36 hours (magnification: 200x).



**Fig. 2.** Immunofluorescence staining showing CD44 receptor in goat oocytes: negative control (A), immature oocyte (B) and matured oocyte (C). The confirmation of the respective nuclear maturation stage is showed in the second row (D, E and F) by Hoechst staining (magnification: 600x).



**Fig. 3.** Immunofluorescence staining showing CD44 receptor in goat early embryos: pronuclear embryo (A), 2-cell-stage embryo (B), 4-cell-stage embryo (C), and 8-cell-stage embryo (D). The confirmation of the respective embryo development stage is showed in the second row (E, F, G and H) by Hoechst staining (magnification: 600x).

#### 4. Discussion

The induction of *cumulus* expansion in COCs is attributed to both synthesis of HA and mucoïd materials and their retention within COCs by connecting HA with HA-binding proteins and proteoglycans (Salustri et al., 1989). In addition, the expansion of *cumulus* cells appears to be essential for normal ovulation (Chen et al., 1993) and subsequent fertilization and pre-implantation embryo development (Vanderhyden and Armstrong, 1989).

It has been demonstrated that immature porcine *cumulus* cells express hyaluronan synthase (HAS 2) and CD44 mRNAs. The expression levels of HAS 2 and CD44 protein increase in the presence of equine chorionic gonadotropin and follicular fluid after IVM suggesting that these genes are upregulated by these substances (Kimura et al., 2002). Furnus et al. (2003) showed that bovine immature oocytes did not express CD44 receptor. Our results disagree with these authors because goat immature oocytes did express CD44. Thus, in goats, the CD44 of immature oocytes could server as receptor for HA deriving from both *cumulus* cells

and oocytes themselves. Several studies have demonstrated that the addition of HA to culture media effectively prevents fragmentation or segmentation of oocytes and supports the development of in vitro-matured, -fertilized, and -cultured oocytes to the blastocyst stage (Sato et al., 1987; Kano et al., 1998). This peculiar characteristic of goats can be responsible for important differences in the IVF protocols between these species.

Campbell et al. (1995) demonstrated by indirect fluorescence that CD44 is present on the surface of human oocytes and *cumulus* cells and continues to be expressed on the embryonic surface until the prehatched blastocyst stage. In addition, the down-regulation occurs on the embryonic surface after implantation. The present study demonstrates that CD44 is present not only in matured oocytes but also in all intermediate pre-implantational stage embryos (2-, 4- and 8-cell-stage embryos).

It has been demonstrated that early embryos contain a large amount of HA, which is produced by cells as a pericellular coat and forms intercellular space preventing the packaging of the cells (Borland et al., 1998). In previous study, Furnus et al. (1998) demonstrated an improvement in embryo development in vitro when HA was present in the culture medium. Our results strongly suggest that the HA could be used during the goat IVF procedure. The influence of the HA could be mediated by the action of its receptor, the glycoprotein CD44.

In this study, we showed that CD44 is expressed on the goat oocytes and embryos in different stages of development. It should be taken into account that, in bovine, HA might benefit embryo development in IVF systems per se or by regulating the action of several factors synthesized by the embryo. If it is true in goats, further experiments are necessary to verify the putative effects of HA during IVF procedure and to elucidate the actions in which CD44 and HA are involved during pre-implantation embryo development.

## **Acknowledgements**

This research was funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, Brazil). M.L.L. Andrade was recipient of Fundação Cearense de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP, Fortaleza, Brazil). V.J.F. Freitas is a senior investigator of CNPq.

## **References**

- Archibong, A.E., Petters, R.M., Johnson, B.H., 1989. Development of porcine embryos from one- and two-cells stages to blastocysts in culture medium supplemented with porcine oviductal fluid. *Biol. Reprod.* 41, 1076–1083.
- Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B., Seed, B., 1990. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61, 1303–1313.
- Bergqvist, A.S., Rodriguez-Martinez, H., 2006. Sulphated glycosaminoglycans (S-GAGs) and syndecans in the bovine oviduct. *Anim. Reprod. Sci.* 93, 46–60.
- Borland, G., Ross, J.A., Guy, K., 1998. Forms and functions of CD44. *Immunology* 93, 139–148.
- Campbell, S., Swam, H.R., Aplin, J.D., Seif, M.W., Kimber, S.J., Elstein, M., 1995. CD44 is expressed throughout preimplantation human embryo development. *Hum. Reprod.* 10, 425–430.
- Cognié, Y., Poulin, N., Locatelli, Y., Mermillod, P., 2004. State-of-the-art production, conservation and transfer of in-vitro-produced embryos in small ruminants. *Reprod. Fert. Dev.* 16, 437–445.
- Furnus, C.C., de Matos, D.G., Martinez, A.G., 1998. Effect of hyaluronic acid on development of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology* 49, 1489–1499.

- Furnus, C.C., Valcarcel, A., Dulout, F.N., Errecalde, A.L., 2003. The hyaluronic acid receptor (CD44) is expressed in bovine oocytes and early stage embryos. *Theriogenology* 60, 1633–1644.
- Jensen, C.E., Zachariae, F., 1958. Studies on the mechanism of ovulation. II. Isolation and analysis of acid mucopolysaccharides in bovine follicular fluid. *Acta Endocrinol.* 27, 356–368.
- Kano, K., Miyano, T., Kato, S., 1998. Effects of glycosaminoglycans on the development of in vitro-matured and –fertilized porcine oocytes to the blastocyst stage in vitro. *Biol. Reprod.* 58, 1226–1232.
- Kawakami, E., Arai, T., Oishi, I., Hori, T., Tsutsui, T., 2000. Induction of dog sperm capacitation by glycosaminoglycans and glycosaminoglycan amounts of oviductal and uterine fluids in bitches. *J. Vet. Med. Sci.* 62, 65–68.
- Kim, H., Lee, G., Hyun, S., Nam, D., Lee, S., Jeong, Y., Kim, S., Kim, J., Kang, S., Lee, B., 2005. Embryotropic effect of glycosaminoglycans and receptors in development of porcine pre-implantation embryos. *Theriogenology* 63, 1167–1180.
- Kimura, N., Konno, Y., Miyoshi, K., Matsumoto, H., Sato, E., 2002. Expression of hyaluronan synthases and CD44 messenger RNAs in porcine cumulus–oocyte complexes during in vitro maturation. *Biol. Reprod.* 66, 707–717.
- Lee, C.N., Ax, R.L., 1984. Concentration and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. *J. Dairy Sci.* 67, 2006–2009.
- Salustri, A., Yanagishita, M., Hascall, V.C., 1989. Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification. *J. Biol. Chem.* 264, 13840–13847.
- Sato, E., Ishibashi, T., Koide, S.S., 1987. Prevention of spontaneous degeneration of mouse oocytes in culture by ovarian glycosaminoglycans. *Biol. Reprod.* 37, 371–376.

- Suchanek, E., Simunic, V., Juretic, D., Grizelj, V., 1994. Follicular fluid contents of hyaluronic acid, follicle-stimulating hormone and steroids relative to the success of in vitro fertilization of human oocytes. *Fertil. Steril.* 62, 347–352.
- Therien, I., Bergeron, A., Bousquet, D., Manjunath, P., 2005. Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. *Mol. Reprod. Dev.* 71, 97–106.
- Underhill, C.B., 1982. Interaction of hyaluronate with the surface of SV.3T3 cells: aggregation and binding studies. *J. Cell Biol.* 56,177–189.
- Vanderhyden, B.C., Armstrong, D.T., 1989. Role of cumulus cells and serum on the in vitro maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. *Biol. Reprod.* 40,720–728.



## **CONCLUSÕES**

Os anticorpos anti-humanos para CD44, clones A3D8 e DF1485, podem ser utilizados com sucesso para a detecção do CD44 em linfócitos e oócitos imaturos na espécie caprina.

Em caprinos, oócitos imaturos, maturados e embriões precoces expressam o CD44, principal receptor para o ácido hialurônico.

## **PERSPECTIVA**

A adição do ácido hialurônico em meios de cultivos tem resultado em um maior percentual de desenvolvimento embrionário em várias espécies, dentre as quais a bovina. Neste contexto, sabendo-se que oócitos e embriões caprinos expressam o CD44, receptor para o ácido hialurônico, este poderá então ser adicionado em meios de cultivo, visando melhores resultados em um sistema de PIV de embriões nesta espécie.

Portanto, estudos posteriores devem ser realizados com o uso desta substância a fim de verificar o possível efeito sobre a produção de blastocistos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFIFY, A.M., CRAIG, S., PAULINO, A.F. Temporal variation in the distribution of hyaluronic acid, CD44s, and CD44v6 in the human endometrium across the menstrual cycle. **Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.** v.14, p. 328-333, 2006.
- ALM, H., KAŹSKA-KSIAŹKIEWICZ, L., RYŃSKA, B., TUCHSCHERER, A. Survival and meiotic competence of bovine oocytes originating from early antral ovarian follicles. **Theriogenology** .v.65, p.1422-1434, 2006.
- AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION (AVMA). Report of the AVMA panel on euthanasia. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 218, p. 669–696, 2001.
- ANGUITA, B., JIMENEZ-MACEDO, A.R., IZQUIERDO, D., MOGAS, T., PARAMIO, M.T. Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (CDC2) expression and MPF activity in prepubertal goat oocytes. **Theriogenology**. v. 67, p. 526–536, 2007.
- APLIN, J.D. Adhesion molecules in implantation. **Rev Reprod.** v. 2,p. 84-93, 1997.
- ARCHIBONG, A.E., PETERS, R.M., JOHNSON, B.H. Development of porcine embryos from one- and two-cells stages to blastocysts in culture medium supplemented with porcine oviductal fluid. **Biol. Reprod.** v. 41, p. 1076–1083, 1989.
- ARMSTRONG, D.T. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. **Theriogenology** v. 55, p. 1303–1322, 2001.
- ARUFFO, A., STAMENKOVIC, I., MELNICK, M.C., UNDERHILL, B., SEED, B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. **Cell.** v. 61, p. 1303–1313, 1990.
- BAJORATH, J. Molecular organization, structural features, and ligand binding characteristics of CD44, a highly variable cell surface glycoprotein with multiple functions. **Proteins** v. 39, 103-111, 2000.
- BALDASSARRE, H., WANG, B., GAUTHIER, M., NEVEU, N., LAZARIS, A., KARATZAS, C.N. Effect of GnRH injection timing in the production of pronuclear-stage zygotes used for DNA microinjection. **Zygote.** v. 12, p. 257-261, 2004.
- BARIL, G.; BREBION, P.; CHESNÉ, P. **Manual de Formación Práctica para el Trasplante de Embriones en Ovejas y Cabras.** FAO, Roma, p.182, 1995.
- BEKER, A.R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M. Effect of 17 beta-estradiol on the in vitro maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**. v. 58, p. 1663-1673, 2002.
- BERGQVIST, A.S. & RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sulphated glycosaminoglycans (S-GAGs) and syndecans in the bovine oviduct. **Anim. Reprod. Sci.** v. 93, p. 46-60, 2006.
- BORLAND, G., ROSS, J.A., GUY, K. Forms and functions of CD44. **Immunology.** v. 93, p. 139–148, 1998.

BORMANN, C.L.; ONGERI, E.M.; KRISHER, R.L. The effect of vitamins during maturation of caprine oocytes on subsequent developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v. 59, p. 1373-1380, 2003.

BOURGUIGNON, L. Y., KALOMIRIS, E. L., LOKESHWAR, V. B. Acylation of the lymphoma transmembrane glycoprotein, GP85, may be required for GP85-ankyrin interaction. **J. Biol. Chem.** v. 266, p. 11761-11765, 1991.

BUCAK, M.N., ATEŞŞAHİN, A., VARIŞLI, O., YÜCE, A., TEKİN, N., AKÇAY, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**. v. 67, p. 1060–1067, 2007.

CAMPBELL, S., SWAM, H.R., APLIN, J.D., SEIF, M.W., KIMBER, S.J., ELSTEIN, M. CD44 is expressed throughout preimplantation human embryo development. **Hum. Reprod.** v. 10, 425–430, 1995.

CAPILA, I, LINHARDT, R.J. Heparin-protein interactions. **Angew.Chem.** v. 41, p. 391–312, 2002.

CHEN, Y.M., YANG, W.K., TING, C.C., TSAI, W.Y., YANG, D.M., WHANG-PENG, J. PERNG, R.P. Cross regulation by IL-10 and IL-2/IL-12 of the helper T cells and the cytolytic activity of lymphocytes from malignant effusions of lung cancer patients. **Chest**. v. 112, p. 960–966, 1997.

CHOI, C.H., ROH, C.R, KIM, T.J., CHOI, Y.L., LEE, J.W., KIM, B.G., LEE, J.H., BAE, D.S. Expression of CD44 adhesion molecules on human placentae. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.** v.128, p. 243-247, 2006.

CICHY, J., PURE, E. The liberation of CD44. **J. Cell. Biol.** v. 161, p. 839-843, 2003.

COGNIÉ, Y. State of art in sheep-goat embryo transfer. **Theriogenology** v. 51, p. 105-116, 1999.

COGNIÉ, Y., BARIL, G., POULIN, N., MERMILLOD, P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. **Theriogenology**, v. 59, p. 171-188, 2003.

COGNIÉ, Y., POULIN, N., LOCATELLI, Y., MERMILLOD, P. State-of-the-art production, conservation and transfer of in-vitro-produced embryos in small ruminants. **Reprod. Fert. Dev.** v. 16, p. 437–445, 2004.

COHEN, M., KAM. Z., ADDADI, L., GEIGER, B. Dynamic study of the transition from hyaluronan- to integrin-mediated adhesion in chondrocytes. **Embo J.** v. 25, p. 302-311, 2006.

COOPER, D.L., DOUGHERTY, G.J. To metastasize or not? Selection of CD44 splice sites. **Nat Med.** v.1, p. 635–637, 1995.

CORDEIRO , M.F., LIMA-VERDE, J.B., LOPES-JÚNIOR, E.S, TEIXEIRA, D.I.A., FARIAS, L.N., SALLES, H.O., SIMPLÍCIO, A.A., RONDINA, D., FREITAS, V.J.F.

Embryo recovery rate in Santa Inês ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. **Small Ruminant Research**. v. 49, p. 19–23, 2003.

COX, J.F., ALFARO, V. In vitro fertilization and development of OPU derived goat and sheep oocytes. **Reprod Domest Anim**. v. 42, p. 83-87, 2007.

DE MATOS, D.G., GASPARRINI, B., PASQUALINI, S.R., THOMPSON, J.G. Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. **Theriogenology**. v. 57, p. 1443-1451, 2002.

ELDER, K., DALE, B. Assisted reproductive technology in farm animals. In: ELDER, K., DALE, B. **In Vitro Fertilization**. 2. ed. Cambridge University Press, Cambridge. Cap.6: 93-108, 2001.

ERNST, S., LANGER, R., COONEY, C.L., SASISEKHARAN, R. Enzymatic degradation of glycosaminoglycans. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**. v. 30, p. 387-444, 1995.

FARIA, M.H., GONÇALVES, B.P., DO PATROCÍNIO, R.M., MORAES-FILHO, M.O., RABENHORSAND, S. H. Expression of Ki-67, topoisomerase IIalpha and c-MYC in astrocytic tumors: correlation with the histopathological grade and proliferative status. **Neuropathology**. v. 26, p. 519–527, 2006.

FIGUEIREDO, F., JONES, G.M., THOUAS, G.A., TROUNSON, A.O. The effect of extracellular matrix molecules on mouse preimplantation embryo development in vitro. **Reprod. Fertil. Dev**. v. 14, p. 443-451, 2002.

FREITAS, V.J.F. **Biotechnologia da reprodução em pequenos ruminantes: produção de embriões por transferência nuclear (clonagem)**. 1 ed. Multicor, Fortaleza, CE. Capítulos 1 e 4, 2006.

FUNDERBURGH, J.L. Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. **Glycobiology**. v. 10, p. 951–958, 2000.

FURNUS, C.C., DE MATOS, D.G., MARTINEZ, A.G. Effect of hyaluronic acid on development of in vitro produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.49, p.1489-1499, 1998.

FURNUS, C.C., VALCARCEL, A., DULOUT, F. N., ERRECALDE, A. L., The hyaluronic acid receptor (CD44) is expressed in bovine oocytes and early stage embryos. **Theriogenology**. v. 60, p. 1633–1644, 2003.

GRAFF, K.J., MEINTJES, M., DYER, V.W, PAUL, J.B., DENNISTON, R.S., ZIOMEK, C., GODKE, R.A. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats. **Theriogenology** v. 51, p.1099-1119, 1999.

GRAZUL-BILSKA, A. T., CHOI, J. T., BILSKI, J. J., WEIGL, R. M., KIRSCH, J. D., KRAFT, K. C., REYNOLDS, L. P., REDMER, D. A. Effects of epidermal growth factor on early embryonic development after in vitro fertilization of oocytes collected from ewes treated with follicle stimulating hormone. **Theriogenology**. v. 59, p. 1449-1457, 2003.

GRIPPO, A.A., WAY, A.L., KILLIAN, G.J. Effect of bovine ampullary and isthmic oviductal fluid on motility, acrosome reaction and fertility of bull spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.** v. 105, p. 57–64, 1995.

GULER, A., POULIN, N., MERMILLOD, P., TERQUI, M., COGNIÉ, Y. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. **Theriogenology**, v. 54, p. 209-218, 2000.

GUTIERREZ-ADAN, A., RIZOS, D., FAIR, T., MOREIRA, P.N., PINTADO, B., DE LA FUENTE, J., BOLAND, M.P., LONERGAN P. Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos culture in vivo or in vivo. **Mol. Reprod. Dev.** v. 68, p.441-448, 2004.

HAFEZ, B., HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 7 ed. Manole, Barueri, SP. Capítulo 7, p.97-103, 2004.

HANDEL, T.M., JOHNSON, Z., CROWN, S.E., LAU, E.K., SWEENEY, M., PROUDFOOT, A.E. Regulation of protein function by glycosaminoglycans - as exemplified by chemokines. **Annu. Rev. Biochem.** v. 74, p. 385-410, 2005.

HUNTER, R.H.F. Ovarian programming of gamete progression and maturation in the female genital-tract. **Zool. J. Linn. Soc.** v. 95, p. 117-124, 1989.

HUSSEIN, T.S., GILCHRIST, R.B., THOMPSON, JG. Oocyte-secreted factors directly affect oocyte developmental competence during in vitro maturation of the bovine cumulus–oocyte complex. **Reprod. Fertil. Dev.** v. 18, p.327, 2006.

HUSZAR, G., OZENCI, C.C., CAYLI, S., ZAVACZKI, Z., HANSCH, E., VIGUE, L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. **Fertil. Steril.** v.79, p. 1616-1624, 2003.

IAKOB, S., KNUDSON, C.B. Hyaluronan fragments activate nitric oxide synthase and the production of nitric oxide by articular chondrocytes. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v. 38, p.123–133, 2006.

IBÁÑEZ, E., ALBERTINI, D. F., OVERSTRÖM, E. W. Demecolcine-induced oocyte enucleation for somatic cell cloning: Coordination between cell-cycle egress, kinetics of cortical cytoskeletal interactions, and second polar body extrusion. **Biol. Reprod.** v. 68, p. 1249-1258,2003.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística** 2007. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 25 maio. 2007.

IHRCKE, N.S., WRENSHALL, L.E., LINDMAN, B.J., PLATT, J.L. Role of heparan sulfate in immune system-blood vessel interactions. **Immunol. Today.** v. 14, p. 500–505, 1993.

ISACKE, C. M., YARWOOD, H.. The hyaluronan receptor, CD44. **The Int. J. Biochem. Cell. Biol.** v. 34, p.718–721, 2002.

IZQUIERDO, D., VILLAMEDIANA, P., LOPEZ-BEJAR, M., PARAMIO, M.T. Effect of in vitro and in vivo culture on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. **Theriogenology**, v. 57, p. 1431-1441, 2002.

JAIN, M., HE, Q., LEE, W.S., KASHIKI, S., FOSTER, L.C., TSAI, J.C., LEE, M.E., HABER, E. Role of CD44 in the reaction of vascular smooth muscle cells to arterial wall injury. **J. Clin. Invest.** v. 98, p. 877, 1996.

JANG, G., LEE, B.C., KANG, S.K., HWANG, W.S., Effect of glycosaminoglycans on the preimplantation development of embryos derived from in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. **Reprod. Fertil. Dev.** v.15, p. 176–185, 2003.

JENSEN, C.E., ZACHARIAE, F. Studies on the mechanism of ovulation. II. Isolation and analysis of acid mucopolysaccharides in bovine follicular fluid. **Acta Endocrinol.** v. 27, p. 356–368, 1958.

KANEKO, T., SAITO, H., TOYA, M., SATIO, T., NAKAHARA, K., HIROI, M. Hyaluronic acid inhibits apoptosis in granulosa cells via CD44. **J. Assist. Reprod. Genet.** v. 17, p. 162-167, 2000.

KANO, K., MIYANO, T., KATO, K. Effects of glycosaminoglycans on the development of in vitro-matured and-fertilized porcine oocytes to the blastocyst stage in vitro. **Biol. Reprod.** v. 58, p. 1226-1232, 1998.

KAWAKAMI, E., ARAI, T., OISHI, I., HORI, T., TSUTSUI, T. Induction of dog sperm capacitation by glycosaminoglycans and glycosaminoglycan amounts of oviductal and uterine fluids in bitches. **J. Vet. Med. Sci.** v. 62, p. 65-68, 2000.

KHARCHE, S.D., GOEL, A.K., JINDAL, S.K., SINHA, N.K. In vitro maturation of caprine oocytes in different concentrations of estrous goat serum. **Small Rumin. Res.** v. 64, p. 186–189, 2006.

KHATIR H, ANOUASSI A, TIBARY A. Effect of follicular size on in vitro developmental competence of oocytes and viability of embryos after transfer in the dromedary (*Camelus dromedarius*). **Anim. Reprod. Sci.** v. 99, p. 413-20, 2007.

KHURANA, N.K., NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. **Biol. Reprod.** v. 62, p. 847-856, 2000.

KIM, J. H., NIWA, K., LIM, J. M., OKUDA, K. Effects of phosphate, energy substrates and amino acids on development of in vitro-matured, in vivo-fertilized bovine oocytes in a chemically defined protein-free culture medium. **Biol. Reprod.** v. 48, p. 1320-1325, 1993.

KIM, H.S., LEE, G.S., HYUN, S.H., NAM, D.H., LEE, S.H., JEONG, Y.W., KIM, S., KIM, J.H., KANG, S.K, LEE, B.C., KANG, S. Embryotropic effect of glycosaminoglycans and receptors in development of porcine pre-implantation embryos. **Theriogenology**. v. 63, p. 1167-1180, 2005.

KIMURA, J, YAMADA, H., TSUKISE, A., MORI, Y, ARAI, K. Production and immunohistochemical characterization of specific antibody to oviductal fluid of miniature 'Shiba' goat. **J. Vet. Med. Sci.** v. 57, p. 427-431, 1995

- KIMURA, N., Y. KONNO, K. MIYOSHI, H. MATSUMOTO, SATO, E. Expression of hyaluronan synthases and CD44 messenger RNAs in porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. **Biol. Reprod.** v. 66, p. 707–717, 2002.
- KJELLÉN, L.; LINDAHL, U. Proteoglycans: structures and interactions. **Annu. Rev. Biochem.** v. 60, p. 443-475, 1991.
- KOBAYASHI, H., SUN , G.W., HIRASHIMA, Y., TERAQ, T. Identification of link protein during follicle development and cumulus cell cultures in rats. **Endocrinology.** v. 140, p. 3835–384, 1999.
- KORNOVSKY, B.S.; MCCOSHEN, J.; KRENTSER, J.; TURLEY, E. The regulation of sperm motility by a novel hyaluronan receptor. **Fertil. Steril.** v. 61, p. 935-940, 1994.
- KUMAR, D., PUROHIT, G.N. Effect of epidermal and insulin like growth factor-1 on cumulus expansion, nuclear maturation and fertilization of buffalo cumulus oocyte complexes in simple serum free media DMEM and Ham's F-10. **Veterinarski Arhiv.** v. 74, p. 13–25, 2004.
- KUMAR, P.S.; SARAVANAN, D., RAJASUNDARAM, R.C., SELVARAJU, M., KATHIRESAN, D. Serum oestradiol and progesterone profiles and their relationship with superovulatory responses in Tellicherry goats treated with eCG and FSH. **Small Rumin. Res.** v. 49, p. 69–77, 2003.
- LEE, C.N., AX, R.L. Concentration and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. **J. Dairy Sci.** v. 67, p. 2006–2009, 1984.
- LEE, C.N., CLAYTON, M.K., BUSHMEYER, S.M., FIRST, N.L., AX, R.L. Glycosaminoglycans in ewe reproductive tracts and their influence on acrosome reactions in bovine spermatozoa in vitro. **J. Anim. Sci.** v.63, p. 861–867, 1986.
- LEESE, H.J. Energy metabolism in preimplantation development. In: Bavister B.D. (Ed). **Preimplantation Embryo Development.** Springer-Verlag. New York, p. 73-82, 1993.
- LEWIS, C. A., TOWNSEND, P. A., ISACKE, C. M. Ca(2+)/calmodulindependent protein kinase mediates the phosphorylation of CD44 required for cell migration on hyaluronan. **Biochem. J.**v. 357, p. 843-850, 2001.
- LI, G-P., LIU, Y., BUNCH, T. D., WHITE, K. L., ASTON, K. I. Asymmetric division of spindle microtubules and microfilaments during bovine meiosis from metaphase I to metaphase III. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 71, p. 220-226, 2005.
- LIMA-VERDE, J.B., JUNIOR, E.S.L., TEIXEIRA, D.I.A., PAULA, N.R.O., MEDEIROS, A.A., RONDINA, D., FREITAS, V.J.F. Transcervical embryo recovery in Saanen goats. **S. Afr. J. Anim. Sci.** v. 33, p. 127-131, 2003.
- LOCATELLI, Y., COGNIÉ, Y., VALLET, J.C., BARIL, G., VERDIER, M., POULIN, N., LEGENDRE, X., MERMILLOD, P. Successful use of oviduct epithelial cell coculture for in vitro production of viable red deer (*Cervus elaphus*) embryos. **Theriogenology.** v. 64, p. 1729-1739, 2005.

LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S.L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D., DARNELL, J.E.. **Mol. Cell. Biol.** 4. ed., W.H. Freedman, New York, 2000.

LOPES JÚNIOR, E.S. **Colheita, criopreservação e transferência de embriões ovinos da raça Morada Nova (variedade branca) em um programa de preservação.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, p. 142, 2005.

MARTINEZ-ROJERO, R.D., HERNANDEZ-IGNACIO, J., HERNANDEZ-HERNANDEZ, H., MICHEL-ACEVES, A.C., VALENCIA-MENDEZ, J. Intrauterine artificial insemination in Creole goats with cooled semen. **Agrociencia.** v. 40, p. 71-76, 2006.

MARTINO, A., PALOMO, M. J., MOGAS, T., PARAMIO, M. T. Influence of the collection technique of prepubertal goat oocytes on in vitro maturation and fertilization. **Theriogenology.** v. 42, p. 859-873, 1994.

MCKELVEY, W.A.C., ROBINSON, J.J., AITKEN, R.P. Repeated recovery of embryos from ewes by laparoscopy. **Theriogenology.** v. 25, p. 855-865, 1986.

MENDES, J. J., BURNS, P.D., DE LA TORRE-SANCHEZ, J.F., SEIDEL, G. J.. Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. **Theriogenology.** v. 60, p. 331–340, 2003.

MERTENS, M.J., LÓPEZ-BEJAR, M.; PARAMIO, M.T. intracytoplasmic glutathione levels in heifer oocytes cultured in different maturation media and its effect on embryo development. **Reprod. Dom. Anim.** v. 40, p. 126–130, 2005.

MIYANO, T., HIRO-OKA, R.E., KANO, K., MIYAKE, M., KUSUNOKI, H., KATO, S. Effects of hyaluronic acid on the development of 1-and 2-cell porcine embryos to the blastocyst stage in vitro. **Theriogenology,** v.41, p.1299-1305, 1994.

MIYOSHI, K., UMEZU, M., SATO, E. Effect of hyaluronic acid on the development of porcine 1-cell embryos produced by a conventional or new in vitro maturation/fertilization system. **Theriogenology.** v. 51, p. 777-784, 1999.

OKAMOTO, I., KAWANO, Y., MURAKAMI, D., SASAYAMA, T., ARAKI, N., MIKI, T., WONG, A. J., SAYA, H. Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway. **J. Cell Biol.** v.155, 755-762, 2001.

OLIVEIRA, A.A.P., LIMA, V.P.M.S. Aspectos econômicos da caprino-ovinocultura tropical brasileira. In: **I Semana da Caprinocultura e da Ovinocultura Tropical Brasileira. Sobral,** p. 7-46. 1994.

OTHA, N., SAITO, H., KUZUMAKI, T., TAKAHASHI, T., ITO, M.M., SAITO, T., NAKAHARA, K., HIROI, M. Expression of CD44 in human cumulus and mural granulosa cells of individual patients in in-vitro fertilization programmes. **Mol. Hum. Reprod.** v. 5, p. 22-28, 1999.

OYAMADA, T., IWAYAMA, H., FUKUI Y. Additional effect of epidermal growth factor during *in vitro* maturation for individual bovine oocytes using a chemically defined medium. **Zygote.** v. 12, p. 143–150, 2004.



- PARK, C.Y., UHM, S.J., SONG, S.J., KIM, K.S., HONG, S.B., CHUNG, K.S., PARK C., LEE, H.T. Increase of ICSI efficiency with hyaluronic acid binding sperm for low aneuploidy frequency in pig. **Theriogenology**. v. 64, p. 1158-1169, 2005.
- PENA, F.J., JOHANNISSON, A., WALLGREN, M., RODRIGUEZ-MARTINEZ ,H. Effect of hyaluronan supplementation on boar sperm motility and membrane lipid architecture status after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 61, p. 63–70, 2004.
- PURDY, P. H. & GRAHAM, J. K. Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. **Biol. Reprod.** v. 71, p. 522-527, 2004.
- PURE, E., CAMP, R. L., PERITT, D., PANETTIERI, R. A., JR, LAZAAR, A. L., NAYAK, S. Defective phosphorylation and hyaluronate binding of CD44 with point mutations in the cytoplasmic domain. **J. Exp. Med.** v. 181, p. 55-62, 1995.
- PUROHIT, G.N., BRADY, M.S.; SHARMA, S.S. Influence of epidermal growth factor and insulin-like growth factor 1 on nuclear maturation and fertilization of buffalo cumulus oocyte complexes in serum free media and their subsequent development in vitro. **Anim Reprod Sci.** v. 87, p. 229-239, 2005.
- QUI , J.J., ZHANG, W.W., WU, Z.L., WANG, Y.H., QIAN, M., LI, Y.P. Delay of ZGA initiation occurred in 2-cell blocked mouse embryos. **Cell Res.** v. 13, p. 179-185, 2003.
- RAFI, A., NAGARKATTI , M., NAGARGATTI, P.S. Hyaluronate-CD44 interaction can induce murine B-cell activation. **Blood**.v. 89, p. 2901, 1997.
- RODRÍGUEZ- GONZÁLEZ, E., LÓPEZ-BEJAR, M., MERTENS, M.J., PARAMIO, M.T. Effects on *in vitro* embryo development and intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation of prepubertal goat oocytes. **Mol. Reprod. Dev.** v. 65, p. 446-453, 2003.
- RODRIGUEZ-DORTA, N., GONZALEZ, F., COGNIÉ, Y., POULIN, N., GUIGNOT, F., TOUZÉ, J.L., BARIL, G., CABRERA, F., ALAMO, D., BATISTA ,M., MERMILLOD, P., GRACIA, A. Successful rate after transfer of vitrified goat embryos in vitro produced according to embryo culture method. In: **ESDAR meeting**, 2006.

- SAEGUSA, M., HASHIMURA, M., OKAYASU, L. CD44 expression in normal, Hyperplastic and malignant endometrium **J. of Pathol.** v. 184, p. 297–306, 1998.
- SAITO, H., KANEKO, T., TAKAHASHI, T., KAWACHIYA, S., SAITO, T., HIROI, M. Hyaluronan in follicular fluids and fertilization of oocytes. **Fertil. Steril.** v. 74, p. 1148–1152, 2000.
- SAKAIRI, A., TSUKISE, A., MEYER, W. Localization of hyaluronic acid in the seminal vesicles of the miniature pig. **Anat. Histol. Embryol.** v. 36, p. 4–9, 2007.
- SALUSTRI, A., YANAGISHITA, M., HASCALL, V.C. Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification. **J. Biol. Chem.** v. 264, p. 13840–13847, 1989.
- SATO, E., ISHIBASHI, T., KOIDE, S.S. Prevention of spontaneous degeneration of mouse oocytes in culture by ovarian glycosamoglycans. **Biol. Reprod.** v. 37, p. 371–376, 1987.
- SAYRE, B.L. Effect of prostaglandins E2 and F2 $\alpha$  on in vitro development and hatching of caprine blastocysts. **Small Rumin. Res.** v. 67, p. 257–263, 2007.
- SHIRAZI, A., SADEGHI, N. The effect of ovine oocyte diameter on nuclear maturation. **Small Rumin. Res.** v. 69, p. 103–107, 2007.
- SOHNREY, B. & HOLTZ, W. Technical Note: Transcervical deep cornual insemination of goats. **J. Anim. Sci.** v. 83, p. 1543–1548, 2005.
- SOMANATH, P.R, SURAH, K, GANDHI, K.K. Caprine sperm acrosome reaction: promotion by progesterone and homologous zona pellucida. **Small Rumin. Res.** v. 37, p. 279–286, 2000.
- SPICER, A.P., OLSON, J.S., MCDONALD, J.A. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the third putative mammalian hyaluronan synthase. **J. Biol. Chem.** v. 272, p. 8957–8961, 1997.
- SUCHANEK, E., SIMUNIC, V., JURETIC, D., GRIZELJ, V. Follicular fluid contents of hyaluronic acid, follicle-stimulating hormone and steroids relative to the success of in vitro fertilization of human oocytes. **Fertil. Steril.** v. 62, p. 347–352, 1994.
- SUGAHARA, K., MIKAMI, T., UYAMA, T., MIZUGUCHI, S., NOMURA, K., KITAGAWA, H. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. **Curr. Opin. Struct. Biol.** v.13, p.612–620, 2003.
- SUMANTRI, C., BOEDIONO, A., OOE, M., MURAKAMI, M., SAHA, S., SUZUKI, T. The effect of sperm-oocyte incubation time on in vitro embryo development using sperm from a tetraparental chimeric bull. **Anim. Reprod. Sci.** v. 48, p. 187–95, 1997.
- SUZUKI, K.; ERIKSSON, K.; SHIMIZU, H.; NAGAIA, T.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of hyaluronan on monospermic penetration of porcine oocytes fertilized in vitro. **Int. J. Androl.** v.23, p.13–21, 2000.

TAJIK, P. & ESFANDABADI, N.S. In vitro maturation of caprine oocytes in different culture media. **Small Rumin. Res.** v. 47, p. 155–158, 2003.

TERVIT, H.R.; WHITTINGHAM, D.G.; ROWSON, L.E.A. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. **J. Reprod. Fertil.** v. 30, p. 493-497, 1972.

THERIEN, I., BERGERON, A., BOUSQUET, D., MANJUNATH, P. Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. **Mol. Reprod. Dev.** v. 71, p. 97-106, 2005.

THOMPSON, J.G. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. **Anim. Reprod. Sci.** v. 60-61, p. 263-275, 2000.

THORNE, R.F., LEGG, J.W., ISACKE, C.M. The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. **J. Cell Sci.** v. 26, p. 373-380, 2004.

TIENTHAI, P., KJELLÉN, L., PERTOFT, H., SUZUKI, K., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Localization and quantitation of hyaluronan and sulfated glycosaminoglycans in the follicular and oviducal fluid of the pig oviduct. **Reprod. Fertil. Dev.** v. 12, p. 173–182. 2000.

TIENTHAI, P., YOKOO, M., KIMURA, N., HELDIN P., SAT

VARNER, D.D., FORREST, D.W., FUENTES, F., TAYLOR, T.S., HOOPER, R.N., BRINSKO, S.P., BLANCHARD, T.L.,. Measurements of glycosaminoglycans in follicular, oviductal and uterine fluids of mares. **J. Reprod. Fertil.** v. 44, p. 297–306, 1991.

VELILLA, E., RODRIGUEZ-GONZALEZ, E., VIDAL, F., PARAMIO, M.T. Microtubule and microfilament organization in immature, in vitro matured and in vitro fertilized prepubertal goat oocytes. **Zygote.** v.13, p. 155-65, 2005.

WEIGEL, P.H., HASCALL, V.C., TAMMI, M. Hyaluronan synthases. **J. Biol. Chem.** v. 272, p. 13997–14000, 1997

WETSCHER, F., HAVLICEK, V., HUBER, T., GILLES, M., TESFAYE, D., GRIESE, J. WIMMERS, K., SCHELLANDER, K., MÜLLER, M., BREM, G., BESENFELDER, U. Intrafallopian transfer of gametes and early stage embryos for in vivo culture in cattle. **Theriogenology.** v. 64, p. 30–40, 2005.

WOERNER, S.M., GIVEHCHIAN, M., DURST, M., SCHNEIDER, A., COSTA, S., MELSHEIMER, P., LACROIX, J., ZOLLER, M., DOEBERITZ, M.K. Expression of CD44 splice variants in normal, dysplastic and neoplastic cervical epithelium. **Clin. Cancer Res.** v. 1, p. 1125–1132, 1995.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: **The Physiology of Reproduction.** Eds. E. Knobil and J. Neil. Raven Press, New York, p. 189–317, 1994.

YANAGIMACHI, R.; USUI, N. Calcium dependence of acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. **Exp. Cell Res.** v. 89, p. 161-174. 1974.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)